

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



وزارت علوم تحقیقات و فناوری

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد

در رشته زیست فناوری میکروبی

عنوان:

کلونینگ و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم زایلاناز متعلق به خانواده‌ی ۱۱ گلیکوزید هیدرولازها استخراج شده از متازنوم شکمبه‌ی شتر

پژوهش‌گر:

مازیار اعتمادزاده

اساتید راهنما:

دکتر حسین شهبانی ظهیری

دکتر کامبیز اکبری نوقابی

شهریور ماه سال ۱۳۹۵



پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

پژوهشکده صنعت و محیط زیست

تعهد نامه

اینجانب مازیار اعتمادزاده دانشجوی کارشناسی ارشد/دکتری رشته زیست فناوری گرایش میکروبی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری اذعان می نمایم که پایان نامه تدوین شده حاضر با عنوان کلونینگ و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم زایلاناز متعلق به خانواده ی ۱۱ گلیکوزید هیدرولازها استخراج شده از متاژنوم شکمبه ی شتر به راهنمایی اساتید محترم جناب آقای دکتر حسین شهبانی ظهیری و جناب آقای دکتر کامبیز اکبری نقابی، توسط اینجانب انجام پذیرفته و صحت و اصالت مطالب تدوین شده در آن، مورد تایید است. در صورت مشاهده مغایرت در مطالب ارائه شده، پژوهشگاه حق دارد بر اساس قوانین و ضوابط جاری کشور، هر گونه اقدام لازم را بعمل آورد. همچنین اعلام می دارد که مطالب مندرج در پایان نامه حاضر تاکنون برای دریافت هیچگونه مدرک و امتیازی توسط اینجانب یا سایر افراد به سایر مراکز ارائه نشده است. در نگارش متن پایان نامه، چارچوب مصوب پژوهشگاه برای تدوین پایان نامه ها به طور کامل مراعات شده است. در نهایت، کلیه حقوق مادی و معنوی مترتب با این پایان نامه، متعلق به پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری می باشد.

نام و نام خانوادگی (دست نویس): مازیار اعتمادزاده

امضاء دانشجو:

تاریخ: ۱۳۹۵/۶/۳۰



وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
پژوهشکده صنعت و محیط زیست

پایان نامه کارشناسی ارشد/ رساله دکتری رشته زیست فناوری میکروبی
گرایش صنعت و محیط زیست

عنوان:

کلونینگ و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم زایلاناز متعلق به خانواده ۱۱
گلیکوزید هیدرولازها استخراج شده از متاژنوم شکمبه شتر

پژوهش گر:

مازیار اعتمادزاده

در تاریخ ۱۳۹۵/۰۶/۳۰ توسط کمیته تخصصی و هیات داوران زیر مورد بررسی قرار گرفت و با نمره
۱۹.۵ و درجه عالی... به تصویب رسید.

امضاء	مرتبه علمی	نام و نام خانوادگی	هیات داوران
	دانشیار	دکتر حسین شهبانی ظهیری	۱- استاد راهنما
	دانشیار	دکتر کامبیز اکبری نوقایی	۲- استاد مشاور
	دانشیار	دکتر علی اصغر کارخانه	۳- استاد داور داخلی
	دانشیار	دکتر جمشید راهب	۴- استاد داور داخلی
			۵- نماینده تحصیلات تکمیلی پژوهشکده
			۶- مدیر آموزشهای تخصصی و تحصیلات تکمیلی

چکیده فارسی:

یکی از عناصر اصلی بخشی از دیواره سلولی گیاهان زایلان است و ۲۰٪ تا ۳۰٪ جرم خشک آن را دربر می‌گیرد. زایلان به صورت کووالان و غیرکووالان به سلولز، لیگنین، پکتین و سایر پلی‌ساکاریدهای باقی‌مانده در دیواره سلولی متصل است. زایلان یک سوسترای هتروپلیمری شامل تکرار اتصال‌های بتا-۱ به ۴ زایلوز در تنه اصلی است که با گروه‌های استیل، آرابینوفورانوزیل و ۴-او-متیل گلوکورونیل آرایش یافته است. جهت هیدرولیز موثر زایلان به ترکیبات مونوساکاریدی آن، به مخلوطی از چند آنزیم که شامل اندو-بتا-۱ به ۴، زایلاناز، بتا-دی-زایلوزیداز، آلفا-ال-آرابینوفورانوزیداز، آلفا-گلوکورونیداز، استیل زایلان استراز و فرولیک/کوماریک اسید استراز نیاز است. یکی از ضروری‌ترین آنزیم‌های مورد نیاز جهت تجزیه زایلان، اندو-بتا ۱ به ۴ زایلانازها هستند. عملکردهای ویژه‌ی هر زایلاناز ممکن است برای صنایع غذایی، دامی، دارویی، پارچه و کاغذ مفید باشد. فرایندهای بیوشیمیایی روی محصولات حاصل از زایلان نیز می‌تواند در تولید اتانول نقش داشته‌باشد که اتانول به عنوان سوخت زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

زایلانازها از منابع قارچی و باکتریایی متعددی استخراج شده‌اند اما امروزه یک منبع جدید برای یافتن این آنزیم‌ها مورد توجه قرار گرفته و آن مطالعه‌ی متاژنومیکس می‌باشد. از میان منابع متاژنومیکس، شتر با مصرف غذاهای شور و سخت کاندید مناسبی برای استخراج آنزیم‌ها در نظر گرفته شده است.

آنزیم زایلاناز در این پژوهش یک آنزیم نمک دوست است و دارای خصوصیات تحمل نمک تا ۲/۵ مولار و تحمل حلال‌های آلی تا ۲۰ درصد نیز بود. همچنین آنزیم در حضور ماده‌ی دناتوره‌کننده‌ی اوره تا ۷٪ از خود افزایش فعالیت نشان داده است. دمای بهینه‌ی عملکرد آنزیم ۴۲ درجه‌ی سانتی-گراد و pH بهینه آن در بافر سیترات نیز ۷ تعیین شد. آنزیم استخراج‌شده در دمای اتاق تا ۲ روز کاهش فعالیت از خود نشان نداد. آنزیم در دمای ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بیش از ۳ ساعت نیز پایدار بود. همچنین آنزیم در حضور تا ۵ مولار NaCl از خود افزایش فعالیت نشان داده است. آنزیم استخراج شده دارای $K_m = 3,71 \text{ mg/ml}$ و $V_{max} = 1415,48 \text{ unit/mg}$ بود.

واژگان کلیدی: زایلاناز، نمک دوست، زایلان، متاژنوم

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: مقدمه و بررسی منابع	۱
۱-۱- آنزیمها	۲
۲-۱- تاریخچه	۲
۳-۱- آنزیم ها و صنعت	۳
۴-۱- طبقه بندی آنزیمها	۵
۱-۴-۱- متازنومیکس و پتانسیل آن در شناسایی کاتالیزورهای زیستی جدید	۵
۱-۴-۲- کاربرد متازنومیکس در شناسایی آنزیمهای دارای کاربرد صنعتی	۶
۱-۴-۳- تاکسونومی شتر	۷
۱-۴-۴- تغذیه ییشت	۸
۱-۴-۵- آناتومی دستگاه گوارش شتر	۸
۱-۶-۶- پراکنش میکروبی شکمبه شتر	۱۰
۱-۶-۱- زایلان و زایلاناز	۱۱
۱-۶-۲- ساختار شیمیایی زایلان	۱۱
۱-۷-۱- زایلانوزوم	۱۳
۱-۷-۱- نحوه ی عملکرد دقیق آنزیمهای تجزیه کننده ی زایلانها	۱۴
۱-۷-۲- زایلانازهای قارچی	۱۶
۱-۷-۳- قارچهای هوازی و بی هوازی	۱۶
۱-۷-۴- زایلانازهای باکتریایی	۱۶
۱-۸-۸- کاربردهای زایلاناز در صنعت	۱۸
۱-۸-۱- کاربرد در تولید کاغذ	۱۸
۱-۸-۲- کاربرد در غذای دام	۱۸
۱-۸-۳- کاربرد در تولید نان و نوشیدنیها	۱۹
۱-۸-۴- کاربرد در صنایع شیمیایی و دارویی	۱۹
۱-۸-۵- تولید بیواتانول	۲۰
۱-۸-۶- تولید گازهای زیستی	۲۲
۱-۸-۷- منسوجات	۲۲
۱-۹- اهمیت، ضرورت و هدف تحقیق	۲۳
۱-۱۰- فرض تحقیق	۲۳

فصل دوم: مواد و روشها	۲۴
۱-۲- باکتریهای مورد استفاده در پژوهش	۲۵
۲-۲- پلازمید مورد استفاده در پژوهش	۲۶
۳-۲- روش انجام پژوهش	۲۷
۱-۳-۲- طراحی آغازگرها	۲۷
۲-۳-۲- استخراج پلازمید	۲۷
۳-۳-۲- تکثیر قطعه‌ی ژنی	۲۸
۳-۱-۳-۲- آمادهمسازی آغازگرهای PCR و شرایط انجام PCR	۲۸
۴-۳-۲- تخلیص باند اختصاصی قطعه‌ی ژنی از روی ژل آگار	۲۹
۵-۳-۲- هضم محصول و حامل <i>pET-28a</i>	۳۰
۶-۳-۲- انجام واکنش اتصال	۳۱
۷-۳-۲- تهیه سلولهای مستعد	۳۱
۸-۳-۲- تراریخته کردن محصول اتصال درون باکتری مستعد <i>DH5α</i> با استفاده از روش شوک حرارتی	۳۲
۴-۲- انتخاب کلنیهای نو ترکیب	۳۳
۱-۴-۲- روش Quick check یا استخراج با فنل و کلروفرم	۳۳
۲-۴-۲- روش Colony PCR	۳۴
۳-۴-۲- استخراج پلازمید و هضم آنزیمی	۳۴
۵-۲- انتقال پلازمید نو ترکیب به باکتری <i>E.coli BL21 (DE3)</i>	۳۴
۱-۵-۲- بیان پروتئین	۳۵
۲-۵-۲- الکتروفورز ژل پلیآکریلامید در حضور سدیمدودسیل سولفات	۳۵
۶-۲- سنجش فعالیت Crude enzyme (آنزیم خالص نشده)	۳۶
۷-۲- رسم منحنی استاندارد زایلوز	۳۸
۱-۷-۲- تخلیص پروتئین در شرایط طبیعی	۳۸
۲-۷-۲- دیالیز	۳۹
۲-۸- تعیین غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد	۴۰
۱-۸-۲- تعیین دمای بهینه‌ی آنزیم	۴۰
۲-۸-۲- تعیین پایداری آنزیم در دماهای مختلف و به مدت ۹۰ دقیقه	۴۱
۹-۲- تعیین pH بهینه برای حداکثر فعالیت آنزیم خالص	۴۱
۱۰-۲- اثر ترکیبات شیمیایی بر فعالیت آنزیم	۴۱
۱۱-۲- بررسی فعالیت و پایداری آنزیم خالص در حضور نمک (سدیم کلرید)	۴۲

۴۲	۱۲-۲- بررسی فعالیت آنزیم در حضور دنا تورهکننده آورده
۴۲	۱۳-۲- زایموگرام
۴۴	فصل سوم: یافته های تحقیق
۴۵	۱-۳- تکثیر و خالص سازی ژن GH11 (xylanase)
۴۵	۲-۳- استخراج پلازمید
۴۶	۳-۳- هضم محصول PCR و حامل <i>pET-28a</i>
۴۷	۴-۳- تایید نو ترکیبی
۴۸	۵-۳- تایید نهایی توسط استخراج پلازمید و هضم آنزیمی
۴۹	۶-۳- مطالعات بیوانفورماتیکی
۵۰	۷-۳- خالص سازی آنزیم زایلاناز
۵۱	۸-۳- بررسی فعالیت آنزیم
۵۲	۹-۳- بررسی فعالیت آنزیم با استفاده از منحنی استاندارد زایلوز
۵۳	۱۰-۳- تعیین دمای بهینه
۵۳	۱۱-۳- پایداری حرارتی آنزیم خالص در دماهای مختلف در زمانهای ۵ تا ۹۰ دقیقه
۵۴	۱۲-۳- تعیین pH بهینه برای حداکثر فعالیت آنزیم خالص
۵۵	۱۴-۳- تاثیر یونها بر فعالیت آنزیم
۵۶	۱۵-۳- بررسی تاثیر حلال های آلی و مهارکننده های مختلف بر فعالیت آنزیم
۵۷	۱۶-۳- بررسی فعالیت و پایداری آنزیم در غلظت های مختلف نمک خوراکی (سدیم کلراید)
۵۹	۱۷-۳- فعالیت آنزیم در حضور ماده ی دنا توره کننده ی آورده
۵۹	۱۸-۳- رسم منحنی استاندارد غلظت پروتئین
۶۰	۱۹-۳- محاسبه ی ویژگی های کینتیکی
۶۱	۲۰-۳- بررسی فعالیت ویژه و عدد نوسازی آنزیم بر روی سوبستراهای سخت
۶۲	فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری
۶۸	پیشنهادهات
۶۹	منابع
۷۲	پیوست ها
۷۹	چکیده انگلیسی

فهرست جدول ها

عنوان	صفحه
جدول ۱-۱ گروهی از مواد لیگنوسلوزی موجود در طبیعت و مواد تشکیل دهنده ی آنها	۱۳
جدول ۲-۱: برخی باکتری‌های تولیدکننده ی زایلاناز Chakdar, H., et al. (2016)	۱۷
جدول ۱-۲: توالی آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر ژن اندو زایلاناز.	۲۷
جدول ۲-۲: مواد مورد نیاز برای انجام واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر	۲۹
جدول ۳-۲: برنامه ی چرخه ی مورد استفاده در واکنش PCR	۲۹
جدول ۴-۲: ترکیبات واکنش هضم آنزیمی دوگانه	۳۰
جدول ۵-۲: هضم آنزیمی دوگانه	۳۰
جدول ۶-۲: ترکیب واکنش اتصال	۳۱
جدول ۷-۲: ترکیبات بافر لیزکننده	۳۷
جدول ۱-۳: بررسی ویژگیهای کیتیکی آنزیم	۶۱
جدول ۲-۳: بررسی فعالیت ویژه ی آنزیم بر روی سوبستراهای سخت	۶۱

فهرست شکل ها

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱ ساختار فیزیولوژیک شکمبهی شتر در مقایسه با سایر نشخوارکنندگان	۹
شکل ۱-۲: ساختار دیواره سلولی گیاهان (Shleser, 1994)	۱۱
شکل ۱-۳: ساختار کلی اتصالات متنوع در انواع مختلف زیلان برگرفته از دیواره ی سلولی گیاهان	۱۲
شکل ۱-۴: نحوه ی عمل زیلانازها را در شکل فوق می توانید ملاحظه بفرمایید	۱۵
شکل ۱-۵: تبدیل لیگنوسلولز به زایلیتول و اتانول	۲۰
شکل ۲-۱ نقشه حلقوی پلازمید pET-28a و جایگاه های برش آن (Novegen, 2005)	۲۶
شکل ۲-۲ ناحیه همسانه سازی- بیان پلازمید pET-28a(+) (Novagen ۲۰۰۵)	۲۷
شکل ۲-۳: خالص سازی ژن <i>GH11</i> (xylanase)	۴۵
شکل ۳-۳: استخراج پلازمید <i>PET-28a</i>	۴۶
شکل ۳-۴: هضم آنزیمی دوگانه ژن و پلازمید	۴۶
شکل ۳-۵: استخراج پلازمید به روش Quick check	۴۷
شکل ۳-۶: Colony PCR به منظور تایید کلنی مثبت	۴۷
شکل ۳-۷: استخراج پلازمید از راست	۴۸
شکل ۳-۸: هضم آنزیمی دوگانه با دو آنزیم <i>EcoRI</i> و <i>SalI</i> و خروج ژن همسانه شده	۴۸
شکل ۳-۹: BLAST پروتئینی توالی ژن زیلاناز	۴۹
شکل ۳-۱۰: درختچه ی فیلوژنی آنزیم زیلاناز استخراج شده از متازنوم شکمبه ی شتر	۵۰
شکل ۳-۱۱: مدلسازی آنزیم <i>GH11 endoxylanase</i> توسط Raptor x	۵۰
شکل ۳-۱۲: <i>SDS-PAGE</i> آنزیم تخلیص شده	۵۱
شکل ۳-۱۳: زایموگرام در سمت چپ (رنگ امیزی با کنگو رد) و در سمت راست Native-PAGE	۵۱
شکل ۳-۱۴: سنجش فعالیت آنزیمی از سمت راست	۵۲
شکل ۳-۱۵: منحنی استاندارد زایلوز	۵۲
شکل ۳-۱۶: اثر دما بر روی فعالیت آنزیم	۵۳
شکل ۳-۱۷: بررسی پایداری حرارتی آنزیم در مدت زمان ۹۰ دقیقه و در دماهای ۳۰-۳۷-۴۲-۵۰-۵۵-۶۰	۵۴
درجهی سانتی گراد	۵۴
شکل ۳-۱۸: بررسی اثر pH روی فعالیت آنزیم در سه بافر سیتрат فسفات pH۳ تا pH۷ - بافر فسفات pH۶	۵۵
تا pH ۹ و بافر <i>Glycin- NaOH</i> برای pH۹ تا Ph۱۰	۵۵
شکل ۳-۱۹: بررسی اثر یونهای مختلف بر فعالیت آنزیم در دو غلظت ۵ میلیمولار و ۱۰ میلیمولار	۵۶
شکل ۳-۲۰: بررسی اثر دترجنتهای یونی- غیر یونی و مهارکنندها بر فعالیت آنزیم	۵۶

- شکل ۳-۲۱: بررسی اثر ترکیبات آلی بر فعالیت آنزیم در دو غلظت متفاوت ۵۷
- شکل ۳-۲۲: بررسی فعالیت آنزیم در حضور نمک خوراکی ۵۸
- شکل ۳-۲۳: بررسی پایداری آنزیم در حضور نمک خوراکی ۵۸
- شکل ۳-۲۴: بررسی فعالیت آنزیم در حضور اوره ۵۹
- شکل ۳-۲۵: منحنی استاندارد غلظت پروتئین به روش بردفورد و با استفاده از Bovine serum albumin .. ۵۹
- شکل ۳-۲۶: منحنی میکایللیس منتون آنزیم زایلاناز ۶۱

فصل اول

مقدمه و بررسی منابع

۱-۱ آنزیم‌ها

پیشرفت در مهندسی ژنتیک و مهندسی پروتئین منجر به تولید آنزیم‌هایی شده که در زمینه‌های مختلف صنعتی و درمانی نقش مهمی را ایفا کرده و جایگزین مواد شیمیایی می‌شوند. امروزه آنزیم‌های با منشا میکروبی با پیشرفت فوق‌العاده‌ای که داشته‌اند، توجه زیادی را به خود اختصاص داده‌اند. این آنزیم‌ها به دلایلی که ذکر می‌شود به وفور در صنایع مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند:

- ۱ - صرفه‌جویی در مصرف انرژی (به علت عدم نیاز این آنزیم‌ها به شرایط سخت دمایی مورد نیاز مواد شیمیایی)، افزایش بازده فرایندهای تولید و همچنین تولید انبوه با هزینه‌ی زمانی و مکانی کمتر شرایط کار را بهبود می‌بخشد.
- ۲- پیشگیری از اثر گلخانه‌ای و سازگاری با محیط زیست (کاهش پسماندهای آب و مواد شیمیایی که منجر به کاهش آلودگی می‌شود).
- ۳- اختصاصیت عمل آنزیم‌ها (کاهش میزان مصرف مواد خام که باعث کاهش هزینه‌ها می‌شود).

۱-۲ تاریخچه

آنزیم‌ها از درشت مولکولهای زیستی هستند که منجر به افزایش سرعت اغلب واکنشهای شیمیایی حیات می‌شوند. در طول تاریخ، بشر با استفاده ناخودآگاه، از فرآیندهای زیستی به تولید محصولات تخمیری مانند نان، مشروبات الکلی، لبنیات، ترشیجات و سرکه و غیره می‌پرداخت. در شش هزار سال قبل از میلاد مسیح، سومریان و بابلیها از مخمرها در مشروب‌سازی استفاده کردند. مصریها در چهار هزار سال قبل با کمک مخمر و خمیرمایه، نان می‌پختند. اصطلاح آنزیم، یک اصطلاح لاتین و به معنای درون مخمری است. از آنجا که فعالیت آنزیم‌ها به شدت مرتبط به فعالیت مخمرها بود این نام به آنزیم‌ها اطلاق شد. کشف آنزیم‌ها در واقع به پژوهش‌های وسیع پاپن و پرسوز وابسته بود. آنان در سال ۱۸۳۳ موفق شدند از جو سبز شده ترکیبی را به نام مالت کشف کنند که نشاسته را به قند مبدل می‌ساخت و این ترکیب را دیاستاز نامیدند که

امروزه این ترکیب به نام آنزیم آمیلاز معروف است (محمدی.رضا ۱۳۸۱). چند سال بعد شوان برای نخستین بار آنزیم پپسین را که موجب گوارش گوشت می‌شد، کشف کرد اما وکونه نخستین کسی بود که واژه‌ی آنزیم را بجای دیاستاز بکار برد. بیشتر تاریخ بیوشیمی، تاریخ تحقیق آنزیمی است. کاتالیزورهای بیولوژیکی برای اولین بار در اواخر قرن ۱۸ طی مطالعات انجام شده بر روی هضم گوشت توسط ترشحات معده مورد تحقیق قرار گرفتند که بعدها این مسیر با تبدیل نشاسته به قندهای ساده توسط بزاق ادامه یافت. «لویی پاستور» گفت که تخمیر قند به الکل توسط مخمر بوسیله خمیرمایه کاتالیز می‌شود. بعد از پاستور، «ادوارد بوخنر» ثابت کرد که تخمیر توسط مولکول‌هایی تسریع می‌گردد که بعد از جدا شدن از سلولها، همچنان فعالیت خود را ادامه می‌دهند. «فردریک کوهن» این مولکول‌ها را «آنزیم» نامید. جداسازی و کریستالیزه کردن آنزیم «اوری آز» در سال ۱۹۲۶ توسط «جیمز سامند» منجر به رفع موانع در مطالعات اولیه آنزیم گردید. به احتمال زیاد نخستین کاربرد آنزیم خالص، استفاده رنین در تهیه پنیر بوده است. اما اولین آنزیمی که به صورت تجاری به بازار ورود پیدا کرد، تریپسین با منشاء حیوانی بود که در سال ۱۹۴۱ توسط دانشمندی به نام Rohm در آلمان تولید شده و برای کاربرد در شوینده‌ها مورد استفاده قرار گرفت. با این حال ورود حقیقی آنزیم‌ها در بازار در سال ۱۹۶۵ و با تولید پروتئاز میکروبی باسیلوس توسط شرکت نووزایم صورت گرفت. در سال‌های ۱۹۳۰ و ۱۹۶۰ آنزیم‌های پکتیناز و آلفا آمیلاز و گلوکوامیلاز وارد عرضه تولید تجاری آنزیم‌ها در صنایع غذایی شدند. در حال حاضر کاربرد عمده آنزیم‌ها در صنایع به این ترتیب می‌باشد: ۳۷٪ شوینده‌ها، ۱۲٪ نساجی، ۱۱٪ نشاسته، ۸٪ نانوبی و ۶٪ خوراک دام.

۳-۱ آنزیم‌ها و صنعت

در دهه‌های پایانی قرن گذشته تولید آنزیم‌ها به شکل خالص و در مقیاس انبوه با پیشرفت‌هایی که در علم تخمیر صورت گرفت میسر شد. دانشمندان در سال‌های گذشته این امکان را پیدا کردند که بوسیله‌ی میکروارگانیسم‌هایی که هر کدام برای سنتز آنزیم خاصی کاربرد دارند برای هر صنعت آنزیم مخصوصی را تولید کنند، برای مثال آنزیم‌هایی که تنها در صنعت نشاسته کاربرد داشته و یا در تولید شوینده‌ها و صنعت نساجی بتوان از آنها استفاده کرد (Fernandez., ۲۰۰۹). آنزیم‌های

صنعتی از سه منبع مختلف گیاهی، حیوانی و میکروبی تهیه می‌شوند. عمل هر آنزیم به شرایط واکنش از قبیل pH، درجه حرارت، شرایط یونی، وجود مقادیر کافی از سوبسترای قابل دسترس و حضور بازدارنده‌های آنزیمی بستگی دارد. همچنین کسب دانش لازم برای ایجاد تغییر در توالی ژنتیکی سلول‌های زنده، میکروارگانیسم‌ها را قادر ساخت آنزیم‌هایی را سنتز کنند که پیش از این وجود نداشته‌اند. ظهور شاخه‌ای نوین در علم بیوتکنولوژی به نام مهندسی پروتئین این امکان را در اختیار دانشمندان قرار داد تا با تولید پروتئین‌های جدید آنزیم‌های نوینی را سنتز کنند. صنایعی که از آنزیم‌ها در مقیاس عظیم استفاده می‌کنند عبارتند از:

- ۱- شوینده‌ها: شامل آنزیم‌های پروتئاز، آمیلاز، سلولاز، لیپاز، ماناز
- ۲- هیدرولیز نشاسته و تولید شربت فروکتوز: آمیلاز، گلوکز آمیلاز، پلولاناز و اینورتاز
- ۳- نوشیدنی‌ها: آمیلاز، پلولاناز، پکتیناز، کیموزین و بتاگالاکتوزیداز، آمیلوگلوکزیداز، اندوگلوکوناز
- ۴- لبنیات: رنین، لیپاز، لاکتاز
- ۵- نساجی: آمیلاز، سلولاز، کاتالاز، پکتیناز، پروتئاز
- ۶- خوراک دام: زایلاناز، اندوگلوکاناز، پروتئاز، فیتاز
- ۷- نانویی: زایلاناز، گلوکز اکسیداز، پروتئاز
- ۸- کاغذسازی: آمیلاز، همی سلولاز، استراز، زایلاناز، سلولاز، لیگنیناز
- ۹- چرمسازی: پروتئاز و لیپاز
- ۱۰- سوخت: سلولاز، زایلاناز
- ۱۱- پلیمر زیستی یا پلاستیک: پراکسیداز، لیپاز، ترانس گلوتامیناز، لاکاز، کاتالاز
- ۱۲- آنزیم‌های با کاربرد خاص
- ۱۲-۱. آنزیم‌های تشخیصی مثل پراکسیداز، فسفاتاز
- ۱۲-۲. آنزیم‌های دارویی: نیتریل هیدراتاز، گلوتریک اسید آسیلاز، پنیسیلین آسیلاز، دی آمینو اسید اکسیداز
- ۱۲-۳. آنزیم‌های مورد استفاده در محافظت از لوازم شخصی: پروتئاز، لیپاز و کاتالاز برای شستشوی لنزهای تماسی.

۱۲-۴. آنزیم‌های مورد استفاده در تکنولوژی DNA: DNA پلیمرازها، DNA لیگاز و آنزیم‌های محدودگر.

۱۳- آنزیم‌های تولیدکننده مواد شیمیایی: فرمات دهیدروژناز، لوسین دهیدروژناز، گلوکز ایزومراز، نیتریل هیدراتاز (Fernandez, ۲۰۰۹).

۴-۱ طبقه‌بندی آنزیم‌ها

در تقسیم‌بندی جدید، آنزیم‌ها را بر حسب واکنش‌های شیمیایی که کاتالیز می‌کنند به ۶ گروه اصلی تقسیم‌بندی می‌کنند که عبارتند از:

- اکسیدوردوکتاز: به طور کلی آنزیم‌هایی را که واکنش‌های اکسایشی و کاهش را کاتالیز می‌کنند، اکسیدوردوکتاز می‌نامند. اغلب این آنزیم‌ها برای انجام عمل خود نیازمند به کوآنزیم هستند.
- هیدرولازها: این گروه آنزیمی بیشتر در واکنش‌های هیدرولیزی شرکت می‌کنند. بیشتر واکنش‌هایی که در دستگاه گوارش توسط آنزیم‌های گوارشی کاتالیز می‌شوند از این نوع می‌باشند.
- ترانسفرازها: واکنش‌های انتقال گروه‌های شیمیایی را به عهده دارند.
- ایزومرازها: این آنزیم‌ها ترکیبی را به ایزومر خودش تبدیل می‌کنند و در واقع هیدروژن را در داخل مولکول تغییر مکان می‌دهند.
- لیگازها یا سنتتازها: این گروه آنزیمی با جدا نمودن یک پیوند پر انرژی از ATP یا ترکیبات مشابه آن باعث تشکیل پیوند بین دو ترکیب می‌گردد.
- لیاازها: این آنزیم‌ها باعث افزایش یا کاهش گروه‌هایی به پیوندهای دوگانه می‌شوند (محمدي، ۱۳۸۱).

۱-۴-۱ متازنومیکس^۱ و پتانسیل آن در شناسایی کاتالیزورهای زیستی جدید

تعداد سلول‌های میکروبی در کره خاکی بالغ بر 10^{30} تخمین زده می‌شود. از این میان باکتری‌ها، بزرگترین سهم را دارا بوده و در حدود 10^6 تا 10^8 می‌باشند. بیش از ۹۹ درصد باکتری‌ها قابل کشت نبوده و نتیجتاً با روش‌های معمول آزمایشگاهی بررسی نمی‌شوند. ژنوم این میکروارگانیسم‌ها غنی از

^۱ Metagenoics

آنزیم‌های متابولیکی می‌باشد که به دلیل قابل کشت نبودن کاملاً ناشناخته باقی مانده‌اند. متاژنومیکس این نقیصه را به خوبی برطرف می‌کند و در تعریف آن می‌توان گفت مطالعه‌ی کل ژنوم میکروارگانیسم‌هایی که در یک محیط خاص زندگی می‌کنند متاژنومیکس نام دارد. در واقع هدف متاژنومیکس پی‌بردن به تنوع ژنتیکی میکروب‌ها در محیط‌های طبیعی از جمله آب، خاک، دریا و دستگاه گوارش مهره‌داران و بی‌مهرگان می‌باشد. محققان در متاژنومیکس به استخراج مستقیم ژنوم از محیط‌های ذکر شده می‌پردازند. در سال ۱۹۸۵ پیس و همکاران از جمله اولین کسانی بودند که همسانه سازی مستقیم DNA از نمونه‌های محیطی را پیشنهاد کردند. آنها با استفاده از این روش DNA استخراج شده از پلانکتون‌ها را در وکتور فاژی همسانه‌سازی و به منظور بررسی توالی 16S rRNA استفاده کردند. متاژنومیکس را می‌توان به دو دسته‌ی مبتنی بر توالی و مبتنی بر عملکرد تقسیم کرد. در روش مبتنی بر عملکرد DNA استخراج شده از نمونه‌ی محیطی بسته به حامل انتخابی به قطعات کوچکتر هضم می‌شود. در حال حاضر بیشتر از ناقل‌های پلازمیدی حداکثر (۱۰ kb) کاسمیدی^۱ و فاژمیدی^۲ (۴۰kb) و BAC (۲۰۰ kb) برای تهیه‌ی کتابخانه ژنومی استفاده می‌شود. پس از ساخت کتابخانه ژنومی از نمونه‌های DNA و ترانسفورم کردن آنها به سویه‌ی مناسب (اکثراً E.coli) و غربالگری و جدا نمودن سویه‌های با فنوتیپ مشخص استفاده می‌گردد. با این روش می‌توان آنزیم‌هایی با قابلیت پزشکی و صنعتی هم‌چون لیپازها، استرازها، پروتئازها، سلولازها و DNA پلیمرازها اشاره کرد. در روش مبتنی بر توالی، DNA جدا شده یا همسانه‌سازی شده و سپس توالی-یابی می‌شود یا به کمک تکنیک Shotgun مستقیماً توالی‌یابی می‌شود. در روش‌های دیگر مبتنی بر توالی از پروب‌ها یا پرایمرهای طراحی شده مخصوص نواحی حفظ‌شده و در نتیجه شناسایی خانواده‌های ژنی استفاده می‌گردد.

۱-۴-۲- کاربرد متاژنومیکس در شناسایی آنزیم‌های دارای کاربرد صنعتی

در حال حاضر بیوتکنولوژی به عنوان صنعتی بزرگ نقش مهمی در تولید طیف وسیعی از داروها، موادشیمیایی و مواد غذایی بر عهده دارد. در اصل بیوتکنولوژی در دهه‌های گذشته تاثیرات زیادی در

^۱ Cosmid

^۲ Phagemid

تشخیص بیماری‌ها، صنایع پتروشیمی و صنایع غذایی داشته است. بدین منظور بیوتکنولوژی در مسیر رقابت با روش‌های شیمیایی سنتی، در جستجوی کاتالیزورهای زیستی کارآمدتر می‌باشد. در نتیجه میکروارگانیسم‌ها به عنوان منبعی غنی و نامحدود این کاتالیزورهای زیستی مورد توجه بوده‌اند. در حقیقت زندگی بدون میکروارگانیسم‌ها روی کره‌ی زمین میسر نمی‌باشد. یکی از منابع متاژنومیکس، دستگاه گوارش حیوانات نشخوارکننده می‌باشد. تا کنون بیش از ۱۵۰ گونه از نشخوارکنندگان شناسایی شده‌اند که شامل حیوانات وحشی و حیوانات اهلی همچون شتر، آهو، گوسفند، بز، گاو و زرافه می‌باشند. این حیوانات گیاه‌خوار بوده و سیستم گوارشی آنها قابلیت تجزیه و استفاده از مواد گیاهی را دارا می‌باشد. این ویژگی حیوانات نشخوارکننده اهمیت زیادی برای انسان دارد زیرا این حیوانات می‌توانند انرژی ذخیره شده در مواد گیاهی را به ترکیبات مغذی تبدیل نمایند. تقریباً نیمی از کربن تثبیت شده توسط فرایند فتوسنتز به صورت دیواره‌ی سلولی در گیاهان ذخیره می‌شود که همین منبع، مورد استفاده‌ی نشخوارکنندگان قرار می‌گیرد. این قابلیت حیوانات نشخوارکننده به دلیل توانایی آنها در نشخوار و تبدیل مواد غذایی به مواد ریز و فرایند تخمیر که در دستگاه گوارش صورت می‌گیرد انجام می‌شود. فرایند تخمیر توسط میکروارگانیسم‌هایی که به صورت همزیست در دستگاه گوارش نشخوارکننده زندگی می‌کنند انجام می‌شود. غالب حیوانات نشخوارکننده دارای معده‌ی چهار قسمتی شامل سیرابی^۱، نگاری^۲، هزارلا^۳ و شیردان^۴ می‌باشند که بخش اصلی در فرایند گوارش بر عهده‌ی شکمبه (سیرابی) بوده که یک مخزن بزرگ مواد غذایی با شرایط بی‌هوازی مناسب برای رشد باکتری‌هایی که در عمل تخمیر نقش دارند می‌باشد. از جمله حیوانات نشخوارکننده می‌توان به شتر اشاره کرد (Gharechahi et al., 2015).

۱-۴-۳- تاکسونومی شتر

شترسانان به دو گروه شترهای عصر جدید و قدیم طبقه بندی می‌شوند که همگی در زیرخانواده‌ی *Camelinae*، خانواده‌ی *Camelidae*، زیررده‌ی *Tylopoda* و رده‌ی *Artiodactyla* قرار می‌گیرند.

¹ Rumen

² Reticulum

³ Omasum

⁴ Abomasum

شترهای تک کوهانه یا به اصطلاح شترهای عربی متعلق به شترهای عصر قدیم و شترهای دوکوهانه متعلق به شترهای عصر جدید بوده و بیشتر در مناطق آمریکای جنوبی دیده می‌شوند. شترها نسبت به سایر نشخوارکنندگان سُم‌های نرم‌تری دارند. شترهای تک‌کوهانه بیشتر در مناطق گرمسیر و شترهای دوکوهانه بیشتر در مناطق سردسیر دیده می‌شوند. تخمین زده می‌شود که بیش از ۱۸ میلیون نفر شتر در جهان وجود دارد که بیش از ۱۶ میلیون از آنها را شترهای تک‌کوهانه تشکیل می‌دهد.

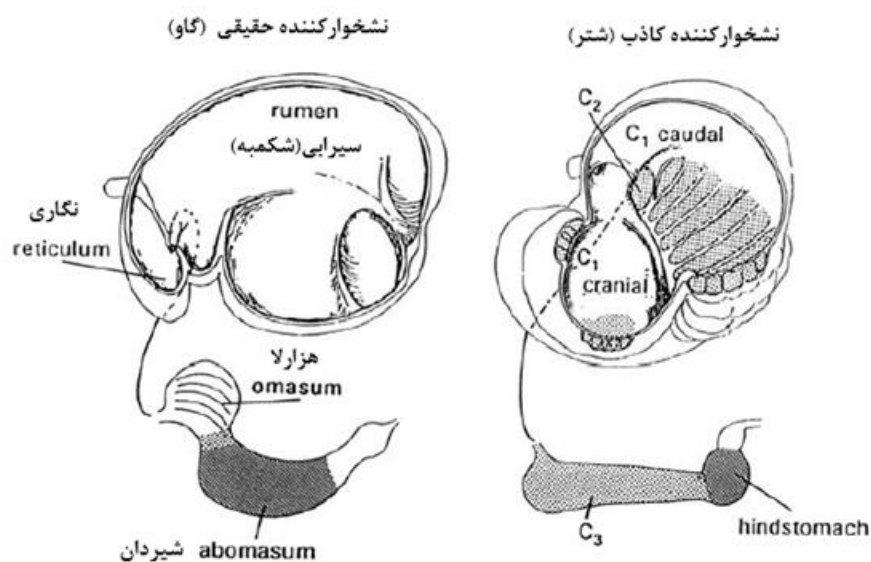
۱-۴-۴- تغذیه‌ی شتر

تغذیه‌ی شتر بسته به شرایط آب و هوایی و محل زندگی متفاوت می‌باشد و به واسطه‌ی گردن بلندشان و لبهای شکافته، بیشتر از قسمت انتهایی درختچه‌ها و درختان و عموماً از گیاهان کوچک تغذیه می‌کنند. شترها بیشتر از گیاهان شور و خاردار دارای الیاف فراوان و دارای مقادیر کم پروتئین استفاده می‌کنند. در نتیجه غذای شترها را مواد با ارزش پایین غذایی تشکیل می‌دهد. شترها در هضم علوفه‌های سخت کارآمدتر از گوسفند و در هضم پروتئین‌ها ضعیف‌تر از گوسفند عمل می‌کنند (Gharachahi et al., 2015). شترها قادرند اوره را با قابلیت بالایی جذب کنند به ویژه زمانی که میزان پروتئین غذایی آنها کاهش یابد.

۱-۴-۵- آناتومی دستگاه گوارش شتر

دستگاه گوارش شتر با سایر نشخوارکنندگان همچون گاو، بز و گوسفند که معده‌ی چهار قسمتی دارند متفاوت است. از این رو به آن نشخوارکننده‌ی کاذب گفته می‌شود. در نشخوارکنندگان حقیقی معده به چهار قسمت سیرابی، نگاری، هزارلا و شیردان تقسیم شده که سه قسمت اول پیش معده و شیردان معده حقیقی را تشکیل می‌دهد. در حالیکه در شتر معده به سه قسمت C1 (معادل شکمبه در سایر نشخوارکنندگان) C2 (معادل نگاری) و C3 (ترکیب هزارلا و شیردان) تشکیل شده است. جزء C1 بزرگترین بخش معده شتر را تشکیل داده و به دو بخش cranial و caudal تقسیم می‌گردد. جزء C2 به صورت یک اندام کوچک از جزء C1 جدا نیست ۶ در صد از حجم معده را تشکیل می‌دهد. جزء C3 طویل بوده و مشابه روده است. تولید اسید معده در قسمت C3 انجام می‌شود. بیش از

۸۰ درصد از حجم معده‌ی حیوان نشخوارکننده را شکمبه تشکیل می‌دهد. علوفه بزرگ دوباره به دهان برگردانده شده تا به ذرات کوچکتر جویده شده و دوباره به شکمبه فرستاده می‌شود تا امکان تجزیه و هضم موادی از قبیل مواد لیگنوسلولزی موجود در آنها فراهم گردد. شایان ذکر است که میزان ماندگاری غذا در شکمبه شتر در مقایسه با سایر نشخوارکنندگان بیشتر بوده و در نتیجه میزان هضم مواد غذایی نیز بیشتر خواهد بود. در واقع شکمبه محیط مناسبی برای رشد میکروارگانیسم‌هایی می‌باشد که توانایی هضم ترکیبات لیگنوسلولزی گیاهی و زایلانی آن را دارا بوده تا انرژی تولید شده توسط آنها به مصرف میزبان برسد. شکمبه در بدو تولد کاملاً عاری از هرگونه میکروب می‌باشد اما بعد از ۲۴ ساعت باکتری‌ها در آن رشد کرده و جمعیت آنها زیاد می‌شود و به غلظتی در حدود 10^9 سلول در هر میلی لیتر می‌رسد. با افزایش سن به تعداد و تنوع جمعیت میکروبی شکمبه افزوده می‌شود. بسیاری از میکروب‌های شکمبه حاوی باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی سلولز و احیاکننده‌ی سولفات و متابولیزه‌کننده هیدروژن می‌باشند. به طور جزئی می‌توان گفت که آرکی‌باکتری‌های^۱ ساکن در شکمبه نقش در متابولیزاسیون هیدروژن و باکتری‌ها و پروتوزوا^۲ نقش مهمی در تجزیه‌ی مواد لیگنوسلولزی دارند (قرچایی، ۱۳۹۳).



شکل ۱-۱ ساختار فیزیولوژیک شکمبه‌ی شتر در مقایسه با سایر نشخوارکنندگان
 . von Engelhardt (2007)

¹ Archaea
² protosoa

۱-۶- پراکنش میکروبی شکمبه شتر

در شکمبه هضم سلولز و مواد لیگنوسلولزی به وسیله ی مجموعه ی پیچیده‌ای از میکروارگانیسم‌ها انجام می‌شود. از باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی مواد لیگنوسلولزی می‌توان به *Fibrobacter succinogenes* یا *Ruminococcus albus* و *ruminococcus flavefaciens* اشاره کرد (قرچایی، ۱۳۹۳).

Butyrovibrio fibrisolvent نیز نقش کلیدی در تجزیه‌ی زایلان^۱ که از اجزای تشکیل دهنده‌ی همی سلولز موجود در دیواره‌ی سلولی گیاهان می‌باشد دارند. باکتری *Prevotella* نیز طیف وسیعی از آنزیم های زایلاناز و سلولاز تولید می‌کند. از جمله قارچ‌های بی‌هوازی ساکن شکمبه می‌توان به *Neocallimastix* اشاره کرد. تخمین زده می‌شود بیش از ۱۰ درصد از میکروارگانیسم‌های موجود در شکمبه را قارچ‌ها تشکیل می‌دهند اما با توجه به اینکه قارچ‌ها هوازی هستند به عنوان بخشی از فلور طبیعی شکمبه در نظر گرفته نمی‌شوند. در مورد نقش پروتوزوا در تجزیه‌ی سلولز نیز پژوهش‌هایی انجام گرفته ولی هنوز به طور کامل این روند درک نشده است. پس در کل شکمبه یک اندام بزرگ و یک محیط زیست بی‌هوازی برای جامعه‌ی میکروبی، قارچی و پروتوزوایی بوده که دمای داخلی آن ثابت و حدود ۳۷ درجه سلسیوس و میزان اسیدیته داخل آن نزدیک به ۷ می‌باشد که به دلیل توانا - نبودن خود به خودی دستگاه گوارش شتر، به تجزیه‌ی مواد لیگنوسلولزی مورد مصرف حیوان کمک می‌کنند. در پایان مواد حاصله از تجزیه‌ی غذای مورد استفاده به اسیدهای چربی همچون استات^۲، پروپیونات^۳ و بوتیرات^۴ تبدیل و وارد گردش خون شده تا در گلوکونئوزنز مورد بهره‌برداری قرار بگیرند. در واقع تنها هزینه‌ی همزیستی جامعه‌ی میکروبی شکمبه برای حیوان استفاده‌ی مواد پروتئینی موجود در مواد غذایی مصرف‌شده‌ی حیوان توسط این میکروارگانیسم‌های همزیست می‌باشد (قرچایی، ۱۳۹۳).

^۱ Xylan

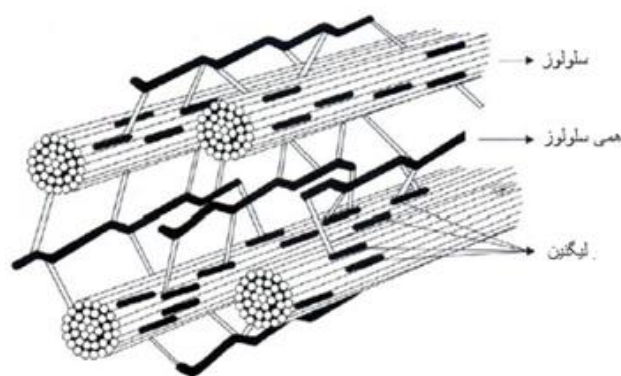
^۲ Acetate

^۳ Propionat

^۴ Butyrate

۱-۶-۱- زیلان و زیلاناز

یکی از عناصر اصلی بخشی از دیواره سلولی گیاهان زیلان است و ۲۰٪ تا ۳۰٪ جرم خشک آن را دربر می‌گیرد. زیلان‌ها یک از گروه‌های همی سلولوز است و به صورت کووالان و غیرکووالان به سلولز، لیگنین، پکتین و سایر پلی ساکاریدهای باقی مانده در دیواره سلولی متصل است (Higuchi, T. (Ed.), 2012) (Coughlan, M. P., & Hazlewood, G. P. 1993) و تجزیه آن را به امری پیچیده بدل می‌کند.

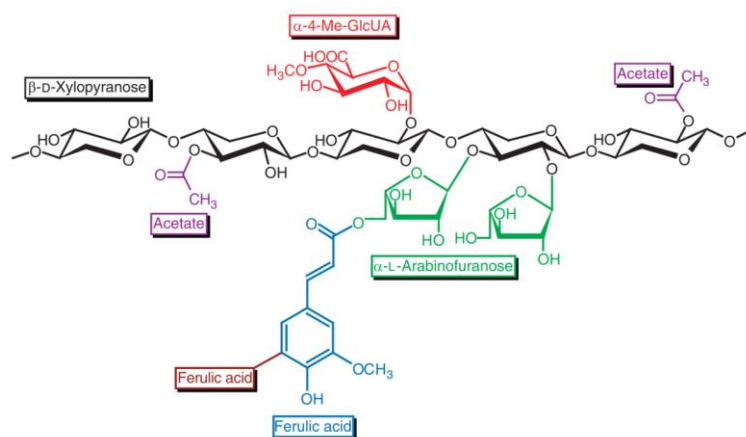


شکل ۱-۲: ساختار دیواره سلولی گیاهان (Shleser, 1994)

زیلاناز از جمله آنزیم‌های هیدرولازی بوده و عملکرد آن در تجزیه بخشی از ساختار دیواره سلولی گیاهان است. زیلانازها بر مبنای توالی آمینواسیدی، ساختار تاخوردگی و مکانیسم‌های کاتالیزی به خانواده های GH (گلیکوزید هیدرولاز) دسته بندی می‌شوند.

۱-۶-۲- ساختار شیمیایی زیلان

زیلان یک سوبسترای هتروپلیمری شامل تکرار اتصالهای بتا-۱ به ۴ زایلوز در تنه‌ی اصلی است که با گروه‌های استیل، آرابینوفورانوزیل و ۴-او-متیل گلوکورونیل آرایش یافته است (شکل ۱) (Saha, B. C.) 2003



شکل ۱-۳: ساختار کلی اتصالات متنوع در انواع مختلف زیلان برگرفته از دیواره ی سلولی گیاهان

فرایندهای بیوشیمیایی روی محصولات حاصل از زیلان می تواند برای صنایع غذایی، دامی و کاغذی مفید باشد و نیز می تواند در تولید اتانول نقش داشته باشد و اتانول به عنوان سوخت زیستی مورد استفاده قرار می گیرد. اما بهترین راه برای استفاده از مواد زیلانی تجزیه ی ساختار سخت آنها است و برای این فرایند نیاز به استفاده از آنزیم های هیدرولیز کننده می باشد (Dodd, D., & Cann, I. K. 2009)

میکروارگانیزم های تجزیه کننده ی زیلان بسیار شایع بوده و بیشتر در محیط هایی که توده ی زیستی گیاهی فراوان می باشد یافت می شوند.

جهت هیدرولیز موثر زیلان به ترکیبات مونوساکاریدی آن، به مخلوطی از چند آنزیم که شامل اندو بتا-۱ به ۴، زیلاناز، بتا-دی-زیلوزیداز، آلفا-ال-آرابینوفورانوزیداز، آلفا-گلوکورونیداز، استیل زیلان استراز و فرولیک/کوماریک اسید استراز نیاز است و سازماندهی آنزیم های زیلانولیتیک درون کمپلکس هایی به نام سلولزوم می باشد.

جدول زیر ضایعات کشاورزی و مواد تشکیل دهنده‌ی آن‌ها را نشان می‌دهد:

جدول ۱-۱ گروهی از مواد لیگنوسلوزی موجود در طبیعت و مواد تشکیل دهنده‌ی آنها

Jorgensen et al., (2007)

مواد لیگنوسلوزی	درصد لیگنین	درصد همی سلولز	درصد سلولز
چوب سخت	۲۵-۱۸	۴۰-۲۴	۵۵-۴۰
چوب نرم	۳۵-۲۵	۳۵-۲۳	۵۰-۴۵
پوست گردو	۴۰-۳۵	۳۰-۲۵	۲۵-۳۰
پوست بلوط	۴۴/۶	۱۰	۲۷/۶
خوشه انگور	۳۳	۱۵	۳۸
کاه گندم	۱۵	۵۰	۳۰
کاه برنج	۱۸	۲۴	۳۲
کاغذ	۱۵-۰	۰	۹۹-۸۵
برگ	۰	۸۵-۸۰	۲۰-۱۵
نخ	۰	۲۰-۵	۹۵-۸۰
روزنامه	۳۰-۱۸	۴۰-۲۵	۵۵-۴۰

۷-۱- زیلانوزوم

گزارشات متعددی مبنی بر وجود زیلانوزوم در میکروب‌های تجزیه کننده‌ی زیلان ارائه شده است. زیلانوزوم‌ها مجزا، چند عملکردی و کمپلکسی از چند آنزیم هستند که در سطح تعدادی میکروب یافت شده‌اند. زیلانوزوم‌ها ساختارهای آنالوگ سلولوزوم هستند.

(Bayer et al., 1994; Sunna and Antranikian, 1997)

در بوتیریوبیرو فیبریولنس (*Butyrivibrio fibrisolens H17c*) زیلانوزوم با زیرواحدهای متصل پروتئینی با وزن مولکولی بیش از ۶۶۹ کیلودالتون وجود دارد. این زیلانوزوم دارای ۱۱ پروتئین با

خاصیت زیلانازی و سه پروتئین با خاصیت گلوکانازی است. (Lin and Thompson, 1991)

در اینجا به توضیح آنزیم‌های مورد نیاز جهت تجزیه‌ی زیلان یعنی زیلانازها اشاره می‌کنیم. اخیراً علاقه به این آنزیم برای تولید محصولات تجاری همچون صنایع غذایی و تولید اتانول زیستی افزایش یافته است. در حال حاضر بیشترین زیلانازها مورد استفاده از منابع قارچی و باکتریایی استخراج می‌شوند.

۱-۷-۱- نحوه‌ی عملکرد دقیق آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی زایلان‌ها

به دلیل هتروژن بودن ساختار زایلان، جهت تجزیه‌ی آن به چندین آنزیم نیاز است و شاید به همین دلیل انتخاب یک سوبسترای مناسب برای تعیین عملکرد این آنزیم‌ها مشکل است.

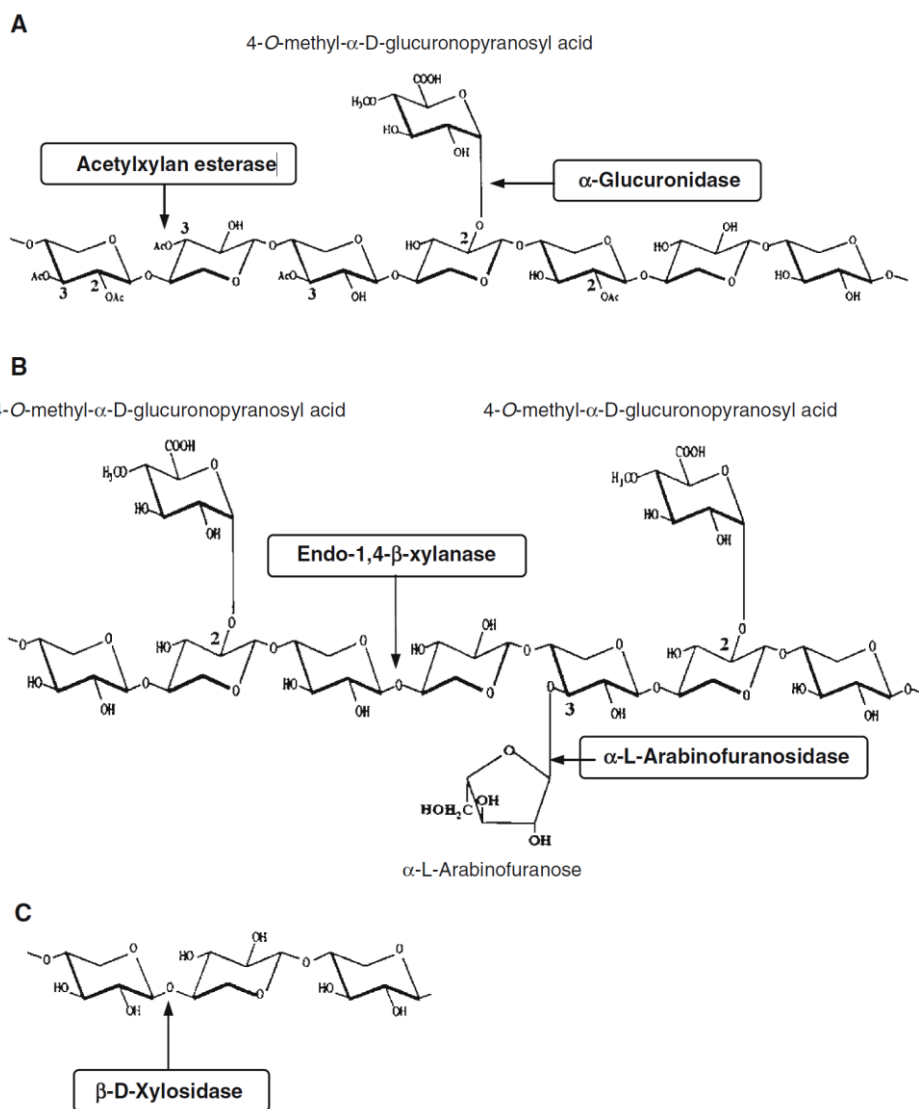
در این تحقیق بیشتر به بررسی عملکرد آنزیم اندو-بتا-۱ به ۴ زایلاناز پرداخته‌ایم. این آنزیم پیوند گلیکوزیدی در اسکلت زایلانی را می‌شکند. البته حمله به زایلان به صورت تصادفی رخ نمی‌دهد و وابسته به نوع سوبسترا مثلاً طول زنجیره و درجه‌ی انشعابات آن هیدرولیز را انجام می‌دهد.

(Bajpai, P. (2014)) محصول اصلی حاصل از هیدرولیز این آنزیم، اولیگومرهای بتا-دی-زایلوپیرانوزیل می‌باشد اما در مراحل بعدی به مولکول‌های کوچک مانند مونو، دی و تری ساکاریدها تبدیل می‌شود. البته آنزیم بتا-دی-زایلوکیداز (β -D-Xylosidases) نیز توانایی هیدرولیز الیگومرهای حاصل از هیدرولیز زایلانازها و تبدیل آن‌ها به واحدهای بتا-دی-زایلوپیرانوزیل (β -D-xylopyranosyl) را دارد.

آنزیم‌های اندوزایلاناز به روش‌های مختلف طبقه‌بندی می‌شوند. مثلاً آقای وانگ و همکارانش (Beg, Q., et al. 2001) آن‌ها را به دو طبقه براساس محصول نهایی که تولید می‌کنند تقسیم‌بندی نمودند: آنزیم‌هایی که انشعاب‌زدایی نمی‌کنند یعنی آن‌هایی که در نقاط انشعابی ۱ و ۳-آلفا-ال-آرابینوفورانوزیل آرابینوزایلان‌ها هیدرولیز انجام نمی‌دهند و آرابینوز آزاد نمی‌کنند. آنزیم‌هایی که انشعاب‌زدایی می‌کنند یعنی برخلاف آنزیم‌های قبلی جایگاه مذکور را هیدرولیز می‌کنند و آرابینوز رها می‌کنند.

از آنزیم‌های دیگر که در تجزیه‌ی زایلان نقش دارند می‌توانیم به :
استیل زایلان استراز، فرولیک اسید استراز، بتا-زایلو سیداز و آلفا-گلوکورونیداز اشاره نمود. به شکل زیر دقت کنید:

α -glucuronidase و β -xylosidases. Ferulic acid esterase, acetylxyylan esterase



شکل ۱-۴: نحوه‌ی عمل زایلانازها را در شکل فوق می‌توانید ملاحظه بفرمایید. Polizeli, M. L. T. M., et al. (2005)

باتوجه به گستردگی گلیکوزید هیدرولازها دو محقق به نام‌های Coutinho و Henrissat دست به ساخت یک پایگاه جامع اطلاعاتی به آدرس اینترنتی (<http://www.cazy.org/>) زده اند که به طور دائم در حال به‌روزرسانی بوده و تاکنون نزدیک به ۱۳۵ خانواده گلیکوزید هیدرولاز در این پایگاه بر اساس تشابه توالی آمینواسیدی طبقه‌بندی شده‌اند.

۱-۷-۲- زایلانا‌های قارچی

در میان منابع میکروبی، قارچ‌های رشته‌ای خیلی جالب هستند چرا که آن‌ها توانایی ترشح آنزیم‌های تجزیه کننده‌ی زایلان را به محیط دارند و سطح تولید ترشح این زایلانا‌ها بسیار بیشتر از مخمرها و باکتری‌ها است.

۱-۷-۳- قارچ‌های هوازی و بی‌هوازی

قارچ‌های هوازی نقش قابل ملاحظه‌ای را در تجزیه‌ی مواد گیاهی داشته و در چوب‌های درحال فساد و ضایعت کشاورزی و خاک یافت می‌شوند. از جمله قارچ‌های هوازی مورد مطالعه می‌توان به *Penicillium pinophilum*-*Talaromyces* - *Trichoderma koningii* - *Trichoderma reesei* *Fusarium solani* و *emersonii* اشاره کرد (Bhat, 1997) از جمله قارچ‌های بی‌هوازی تولیدکننده‌ی زایلانا می‌توان به *Anaeromyces* و *Cytlamyces*، و *Orpinomyces* اشاره کرد که برخلاف قارچ‌های هوازی بوده و تولید آنزیم آن‌ها به صورت کمپلکس سلولزوم بوده و حاوی آنزیم‌های مختلفی هم‌چون اندوگلوکاناز، سلویوهِیدرولاز، ماناز و زایلانا می‌باشند (Orpin, C. G. and K. N. Joblin 1997).

۱-۷-۴- زایلانا‌های باکتریایی

وجود زایلانا‌های باکتریایی در بسیاری از گروه‌های باکتریایی گزارش شده است. انواع متنوع زایلانا با پایداری نسبت به گرما و سرما کشف و از میکروارگانیسم‌های مختلفی شامل باکتری‌های اکستریموفیل تخلیص شده است. (جدول ۱-۲)

جدول ۱-۲: برخی باکتری‌های تولیدکننده زیلاتاز (Chakdar, H., et al. (2016)

Different groups of bacteria producing diverse xylanases										
S. no.	Name of the organism	Substrate used	Optimum conditions for xylanase activity				Purification of xylanase			
			Temp (°C)	pH	K _m (mg/ml)	V _{max} (μmol/mg/min)	Methods	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Mesophilic										
1.	<i>Sorangium cellulosum</i> So9733-1	OSX	30	7.0	38.13	10.69	Dialysis and concentration after Ni-affinity	4.11	4.03	43.84
2.	<i>Bacillus</i> sp. SN5	BeX	40	7.0	0.6	114	Ni-affinity chromatography	104.7	–	–
3.	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> KJ-03	BiX	40	7.4	–	–	Ni-affinity chromatography	33	7.5	58
4.	<i>Bacillus</i> sp. SV-34S	BiX	50	6.5	3.7	133.33 IU/ml	(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation Carboxymethyl-sephadex C-50	2803.1 3417.2	10.62 12.94	88.0 13.44
5.	<i>Streptomyces</i> sp. 7b	WB	50	6	–	–	(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation (50-75 %) CM-sephadex	79.43 183.50	2.46	47.80 43.41
6.	<i>Burkholderia</i> sp. DMAX	BiX	50	8.6	12.75	165	(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation (30-70 %)	–	3.21	48
Thermophilic										
7.	<i>Anoxybacillus favithermus</i> TWXYL3	OSX	65	6 and 8	–	–	HiPrep 26/60 Sephacryl S-200	2.2	27.5	–
8.	<i>Bacillus</i> sp. GRE7	OSX	70	7.0	2.23	296.8 IU/mg	(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation (40-80 %) DEAE- cellulose Sephadex G-75	191.1 582.9 1392.6	3.9 11.9 28.5	71 48 27
9.	<i>Streptomyces thermovulgaris</i> TITSR1948	BeX	65	6.5	0.76	303U/mg	DEAE- Toyopearl Toyopearl HW-55	27 110	3.70 15.0	– –
S. no.	Name of the organism	Substrate used	Optimum conditions for xylanase activity				Purification of xylanase			
			Temp (°C)	pH	K _m (mg/ml)	V _{max} (μmol/mg/min)	Methods	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
10.	<i>Arthrobacter</i> sp.	WB	100	9.0	0.9	3571	(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation Sephadex G-200 DEAE- sepharose FF CM-sepharose FF	162 282.6 444.2 1697.7	2 3.5 5.5 21	74 62 49 14
11.	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	BiX	80	8.5	2.6	31.2	Ni ²⁺ -NTA agarose resins	10.2	–	–
12.	<i>Stentrophomonas maltophilia</i>	WB	80	9.0	–	–	(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation Sephadex G-100 DEAE-cellulose	82.40 141.11 313.38	1.43 2.45 5.43	57.11 37.36 19.18
13.	<i>Thermotoga thermarum</i>	BeX	80	6.0	1.8	769	Heat treatment Ni-affinity chromatography	80 192	2.9 6.9	93.7 82.3
14.	<i>Acidothermus cellulolyticus</i> 11B	OSX	90	6.0	0.53	350	Heat-treated extract Hydroxyapatite	15.6 376	4.1 97.7	88 12
farine										
15.	<i>Bacillus</i> sp.	OSX	55	9.0	–	–	(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation (60 %) DEAE-cellulose	31.27 53.0	2.6 1.69	55 34
16.	<i>Arthrobacter</i> sp. MTCC6915	SD	60	9.0	–	–	(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	453.6 U/ml	–	–
17.	<i>Glancecola mesophila</i> KMM 241	BeX	30	7.0	1.22	98.31	(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation Dialysis Ni ²⁺ -NTA agarose resins	77 – –	9.1	17.4
18.	<i>Vibrio</i> sp. XY-214	β -1,3 xylan	37	7.0	–	–	(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation Dialysis Q Sepharose FF Ether-Toyopearl 650S Superdex 200	9.9 – – –	83	24
19.	<i>Alcaligenes</i> sp. XY-234	β -1,3 xylan from <i>Caulerapa racemosa</i>	40	7.5	0.40	–	(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation Dialysis Q Sepharose FF Ether-Toyopearl 650S Superdex 200 Hydroxyapatite MonoQ	– – – – –	292	9

در میان باکتری‌ها، *Bacillus* منبع بالقوه زیلائانازها شناخته شده است و تعدادی از باسیلوس‌ها مانند *B. circulans*، *B. stearothermophilus*، *B. amyloliquefaciens*، *B. subtilis* و *B. pumilus* دارای فعالیت زیلائانازی قابل توجه گزارش شده‌اند. زیلائانازهای مقاوم به گرما از باکتری‌های *Rhodothermus marinus*، *Stenotrophomonas maltophila*، *Bacillus thermocellum*، *Thermotoga sp.* و *Streptomyces sp.* که در دمای بین ۶۰ تا ۷۰ درجه‌ی سلسیوس فعالیت دارند گزارش شده‌است. اگرچه زیلائانازهای سازگار با سرما خیلی رایج نیستند اما باکتری‌هایی مانند *Flavobacterium frigidarium* و *Clostridium sp. PXYL1* با توانایی تولید چنین زیلائانازهایی گزارش شده‌اند. باکتری‌ها نسبت به قارچ‌ها دارای مزایای بیشتر جهت تولید زیلائانازها هستند و pH بهینه برای زیلائانازهای باکتریایی به صورت خشتی و بازی است درحالی که برای زیلائانازهای قارچی این pH در دامنه‌ی اسیدی است. نیاز به pH پایین برای رشد قارچ و تولید زیلائاناز قارچی باعث افزوده شدن فرایندهای آزمایشی در مراحل بعدی خواهد شد که از جذابیت زیلائاناز قارچی می‌کاهد. (Chakdar, H., et al. (2016)

۸-۱ کاربردهای زیلائاناز در صنعت

اولین بار از زیلائاناز در دهه‌ی ۱۹۸۰ در آماده‌سازی مواد غذایی دام و بعداً صنایع غذایی، نساجی، کاغذ و شیمی مورد استفاده قرار گرفت. گزارشات از زیلائاناز، سلولاز همراه با پکتیناز حدود ۲۰٪ تجارت جهانی آنزیم را به خود اختصاص داده است.

۸-۱-۱ کاربرد در تولید کاغذ

آنزیم‌های همی سلولوتیک به‌ویژه زیلائانازها برای سفید سازی خمیر کاغذ مورد استفاده قرار می‌گیرند فواید متنوع استفاده از آنزیم زیلائاناز در صنعت سفید سازی خمیر کاغذ وجود دارد.

۸-۱-۲ کاربرد در غذای دام

استفاده از آنزیم‌های زیلائاناز در جهت تهیه‌ی علوفه برای دام یکی از مهمترین اقدامات در صنعت کشاورزی است که منافع مالی زیادی را به همراه خواهد داشت.

زایلانازها همراه با گلوکانازها، سلولازها، پروتئازها، آمیلازها، فیتازها، گالاکتوزیدازها، پکتینازها و لیپازها در غذاهای دامی استفاده می‌شوند. زایلاناز با شکست آرابینوزایلان در ترکیب غذایی باعث کاهش ویسکوزیته‌ی مواد خام می‌شود. (Twomey et al 2003) بدین ترتیب شرایط برای هضم بهتر غذا و جذب بهتر آن فراهم می‌شود و دام‌ها انرژی کمتری برای فرایند هضم و جذب مصرف می‌کنند و با این کار می‌توانیم بهره‌وری و بازدهی تولید را افزایش دهیم.

۳-۸-۱- کاربرد در تولید نان و نوشیدنی‌ها

با استفاده از زایلاناز در نانوائی به عمل آمدن خمیر نان سریع‌تر و بهتر اتفاق می‌افتد چرا که با اثر این آنزیم خمیر بیشتر آب می‌گیرد و کیفیت بهتری پیدا خواهد نمود. (Chakdar, H., et al. (2016))

صنعت آبمیوه و شراب جایگاه خوبی برای استفاده از آنزیم‌ها است. امروزه از زایلانازها، سلولازها، آمیلازها و پکتینازها در جهت افزایش بازده تولید نوشیدنی‌هایی مانند آب میوه‌ها و آب سبزیجات و در جهت نگهداری پالپ، افزایش نگهداری عطر و بو، روغن‌های ضروری، ویتامین‌ها، نمک‌های معدنی، رنگ‌های خوراکی، رنگیزه‌ها و غیره همچنین کاهش ویسکوزیته، تجزیه مواد زائد فیزیکی و شیمیایی جهت شفاف شدن نوشیدنی‌ها استفاده می‌شود. (Chakdar, H., et al. (2016))

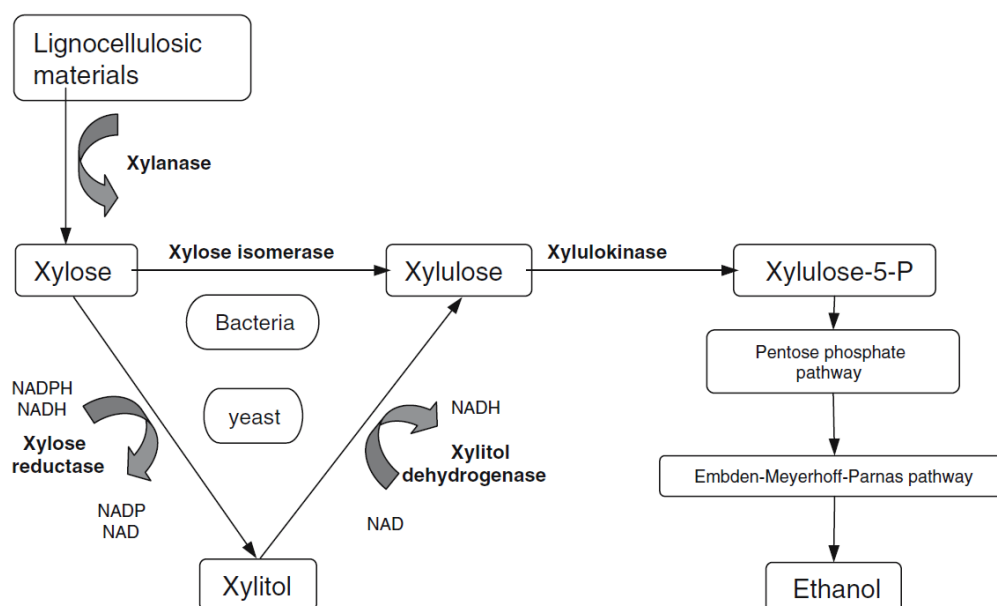
۴-۸-۱- کاربرد در صنایع شیمیایی و دارویی

زایلان و زایلانازها سهم اندکی در صنعت داروسازی دارند. زایلانازها همراه با کمپلکسی از آنزیم‌ها (همی سلولازها، پروتئازها و سایرین) بعضی مواقع به عنوان منابع رژیمی یا به عنوان درمان سوء تغذیه به ترکیبات غذایی اضافه می‌شوند اما محصولات پزشکی کمی از آن‌ها با این فرمولاسیون می‌توان یافت.

محصولات حاصل از هیدرولیز زیلان مانند بتا-دی-زایلوپیرانوزیل می‌تواند به مایعات قابل احتراق (اتانول)، محلول‌ها و شیرین‌کننده‌های کم کالری غیرطبیعی تبدیل شوند.

اولین قدم جهت تولید اتانول زیستی، لیگنین‌زدایی از مواد همی سلولوزی غنی در زایلان است، که با زایلانازها و همی سلولازها هیدرولیز می‌شوند و تولید قندهایی مانند زیرواحدهای بتا-دی-

زایلانوپیرانوزیل می‌کنند. سپس این محصولات توسط فرایند تخمیر بویژه توسط مخمرهایی مانند *Candida shehatae* و *Pichia stipitis* تولید زایلیتول یا اتانول می‌کنند. (Chakdar, H., et al. (2016)



شکل ۱-۵: تبدیل لیگنوسلولز به زایلیتول و اتانول

زایلیتول یک پلی‌الکل با قدرت شیرین‌کنندگی قابل مقایسه با ساکارز است. (Chakdar, H., et al. (2016)) آن یک شیرین‌کننده‌ی غیر سرطان‌زا و برای افراد دیابتی و چاق مناسب است همچنین برای جلوگیری از پوکی استخوان و عفونت‌های تنفسی، اختلالات متابولیسمی لیپیدها و آسیب‌های کلیوی پیشنهاد می‌شود.

اگرچه هیدرولیز آنزیمی زایلان یک روش امیدبخش جهت به دست‌آوردن زیرواحدهای بتا-دی-زایلوپیرانوزیل است، اما در حال حاضر زایلیتول تجاری در مقیاس وسیع توسط کاتالیزهای شیمیایی تولید می‌شود.

۱-۸-۵- تولید بیواتانول

با توجه به افزایش قیمت سوخت‌ها و همچنین آلودگی‌هایی که سوخت‌های رایج فسیلی برای محیط زیست ایفا می‌کنند و همچنین تغییرات ناگهانی اقلیمی ناشی از مصرف این سوخت‌ها تقاضا برای جایگزینی این سوخت‌ها با سوخت‌های سبز و بی‌خطر افزون شده است (Li et al., 2009).

اتانول یک مایع بی‌رنگ و با قابلیت زیست تخریب‌پذیری و سمیت کم بوده و می‌تواند جایگزین سوخت‌های وسایل حمل و نقل باشد و مزیت استفاده از آن نسبت به سوخت‌های فسیلی می‌توان به کم کردن حجم تولید گازهای گلخانه‌ای و تولید CO₂ کمتر اشاره کرد. از طرفی باید به این نکته توجه داشت که اضافه کردن بیواتانول به سوخت‌های فسیلی فعلی تا ۵ درصد امکان‌پذیر بوده بدون آنکه هیچگونه تغییری در مهندسی موتور وسایل حمل و نقل ایجاد شود. در حال حاضر زیست‌توده‌ی گیاهی تنها منبع معدنی موجود برای تولید سوخت زیستی بوده و دارای کاربردهای زیادی می‌باشد و مزیت عمده‌ی آن به عنوان ماده‌ی اولیه و در سازگار بودن آنها با انسان و دیگر اشکال حیات می‌باشد. در این رابطه می‌توان از مواد لیگنوسلولزی همچون کاغذهای باطله و مواد چوبی و ضایعات کشاورزی بهره جست (Hill et al., 2006).

تولید بیواتانول در سه مرحله اساسی صورت می‌پذیرد:

الف: یک تیمار ابتدایی فیزیکی در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای آزادسازی سلولز و همی‌سلولز از ترکیبات همراهشان همچون لیگنین که با این کار هضم آنزیمی بسیار موثرتر انجام خواهد پذیرفت (Mosier et al., 2005).

ب: تبدیل سلولز و همی‌سلولز به قندها که به ترکیبی از آنزیم‌های زیلاناز، اندوگلوکاناز، آرابینوزیداز، زایلوزیداز و ... نیاز دارد.

ج: عمل تخمیر با یک ارگانیسم مناسب همچون مخمر برای به دست آوردن اتانول.

پس با توجه به آنکه طبق پیش‌بینی‌های انجام شده تولید سوخت‌های فسیلی تا سال ۲۰۵۰ از ۲۵ میلیارد بشکه در سال به ۵ میلیارد کاهش پیدا خواهد کرد، استفاده از سوخت‌های زیستی اهمیت خود را بیش‌تر نشان خواهد داد (Campbell and Laherrere, 1998). در این راستا کشور آمریکا از سال ۱۹۸۰ به استفاده از اتانول در گازوییل و سوخت خودروها روی آورده‌است و هم‌اکنون بیش از ۱۰ درصد سوخت خودروها در آن کشور از بیواتانول تشکیل شده است (Sun and Cheng, 2002). کشور برزیل نمونه‌ی کامل دیگری در این زمینه می‌باشد. این کشور در سال ۱۹۷۰ نزدیک ۵۰ میلیون تن نیشکر تولید نمود که توانست از آنها ۵ میلیون تن شکر تولید کرده و باقیمانده و ضایعات نیشکر را به عنوان ماده‌ی اولیه در برنامه‌ی جامع خود برای تولید بیواتانول به کار ببرد به گونه‌ای که هم‌اکنون تولید سالیانه نیشکر در این کشور ۱۸۶ میلیون تن بوده و نزدیک به ۲۰ درصد از سوخت

خودروهای آن کشور را اتانول تشکیل می‌دهد (Soccol et al., 2010). هم اکنون میزان اتانول مصرفی توسط بخش حمل و نقل آمریکا به میزان ۴۵۴۰ میلیون لیتر بوده و محققین آن کشور در تلاشند با تغییر ساختار موتورهای اتومبیل‌ها میزان اتانول تولیدی در سوخت را به ۸۵٪ در مقابل ۱۵ درصد گازوئیل افزایش دهند (Sun and Cheng, 2002).

۱-۸-۶- تولید گازهای زیستی

انرژی‌های جایگزین باید به دلایل محیط زیستی و هم به دلایل اختصاصی مورد توجه قرار بگیرد زیرا این انرژی از مواد سستی لیگنوسلولزی همچون ذرت و گندم قابل تحصیل می‌باشد (Levin et al., 2007). گازهای زیستی در ۵۵ تا ۷۰ درصد موارد متان و در ۳۰ تا ۴۰ درصد شامل کربن دی اکسید می‌باشد. در صورت استفاده از ذرت به عنوان ماده‌ی اولیه در هر هکتار و در طول یک سال، تولید ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰ تن متان تولید می‌شود. همچنین مواد دیگری همچون ضایعات حبوبات، این مقدار به ۳۲۰۰ تا ۴۵۰۰ تن افزایش می‌یابد. همچنین استفاده از گل آفتابگردان و علف‌های کوهی نیز در رابطه با تولید گازهای زیستی مفید گزارش شده است. هیدروژن نیز به عنوان یک گاز زیستی در نظر گرفته می‌شود و میکروارگانیسم‌های بسیاری، توانایی تولید مقادیر بالای هیدروژن در صورت استفاده مواد لیگنوسلولزی را دارند (Amon et al., 2007).

۷-۸-۱- منسوجات

کمپلکس زایلانازی در صنعت منسوجات جهت فرآوری فایبرهای گیاهی می‌تواند استفاده شود. برای این کار، زایلاناز می‌بایست از هر نوع آنزیم سلولیتیک آزاد باشد. یک فرایند شامل در معرض قرار دادن نوعی علف چینی با زایلاناز جهت آزادسازی فایبرهای بلند سلولزی است. بعد از استفاده از این روش دیگر نیازی به روشهای قوی سفیدکنندگی نیست چرا که لیگنین تحت اکسیداسیون قرار نمی‌گیرد و بنابراین الیاف به سمت تیرگی پیش نمی‌روند. (Bajpai, P. (2014))

۹-۱- اهمیت، ضرورت و هدف تحقیق

در حال حاضر آنزیم ها در تولیدات صنعتی گوناگون و فرایندها و حوزه های کاربردی جدید که به طور دائم در حال اضافه شدن هم هستند استفاده می شوند. و به لطف پیشرفت در زیست فناوری مدرن، امروزه آنزیم های کاربردی ای می توانند ایجاد شوند که تا چند دهه ی قبل هیچ کس انتظار نداشت. معرفی آنزیم ها به عنوان کاتالیزورهای کارآمد منجر به ذخیره ی چشمگیر منابع مانند انرژی و آب به نفع صنعت، در تحقیق و محیط زیست می شود. در یک جهان با افزایش جمعیت سریع و نزدیک شدن به اتمام بسیاری از منابع، فناوری آنزیم پتانسیل بسیار عالی برای بسیاری از صنایع به منظور برخورد با چالش هایی که در سال های آتی با آن مواجه خواهیم شد ارائه می کند. بنابراین، تلاش ها برای دستیابی به تولید بیش از حد ارزان این کاتالیزور زیستی در میزبان هترولوگ و تغییرشان توسط ابزارهای شیمیایی یا مهندسی پروتئین برای بدست آوردن آنزیم های قوی تر و فعال تر صورت می گیرد. برای تولید پروتئین در سطوح بالا بهتر است به جای منبع طبیعی آن از ارگانیسم های مهندسی شده استفاده کرد، زیرا: منابع طبیعی تولید پروتئین ها محدود هستند، غلظت پروتئین مورد علاقه عموماً پایین است، تهیه سوبسترای لازم برای القای بیان پروتئین در سویه ی وحشی ممکن است مقرون به صرفه نباشد. استخراج آن بسیار پرهزینه و حتی غیرممکن می باشد و علاوه بر این ها پروتئین استخراج شده ممکن است آلوده به مواد سمی باشد.

هدف از این تحقیق، کلونینگ و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم گلوکوزیداز هیدرولاز که احتمالاً متعلق به باکتری رومینوکوکوس است می باشد.

۱۰-۱- فرض تحقیق

از *Blast* کردن توالی ژن مورد نظر حدوداً ۶۲ درصد تشابه با آنزیم زایلاناز از نوع *B-(1-4) endo-xylanase* متعلق به *Ruminococcus flavefaciens* مشاهده گردید. فرض ما بر این است که ژن مورد نظر آنزیم زایلاناز را کد می کند و با توجه به شرایط شکمبه شتر، انتظار داریم آنزیم مورد نظر دارای ویژگی خاص مانند تحمل دمایی یا نمکی داشته باشد.

فصل دوم

مواد و روش ها

تجهیزات و مواد مورد استفاده، انواع محلول‌ها و ترکیبات، بافرها و محیط کشت‌های تهیه شده به ترتیب در پیوست آمده است.

۲-۱- باکتری‌های مورد استفاده در پژوهش

در این پژوهش از DNA استخراج شده از شکمبه شتر که قبلاً توسط (Gharechahi و همکارانش ۲۰۱۵) جداسازی شده بود استفاده گردید و برای تهیه توالی ژنی آنزیم‌های دخیل در تجزیه‌ی زیلان و مشخصاً خانواده‌ی ۱۱ گلیکوزید هیدرولازها استفاده شد. دو سویه مختلف باکتری اشرشیاکلی نیز به نام‌های *DH5α* و *BL21 (DE3)* که از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهیه شده بود به ترتیب برای تکثیر حامل و همچنین بیان ژن مورد استفاده قرار گرفتند. سویه‌ی *DH5α* دارای ژنوتیپ زیر می‌باشد:

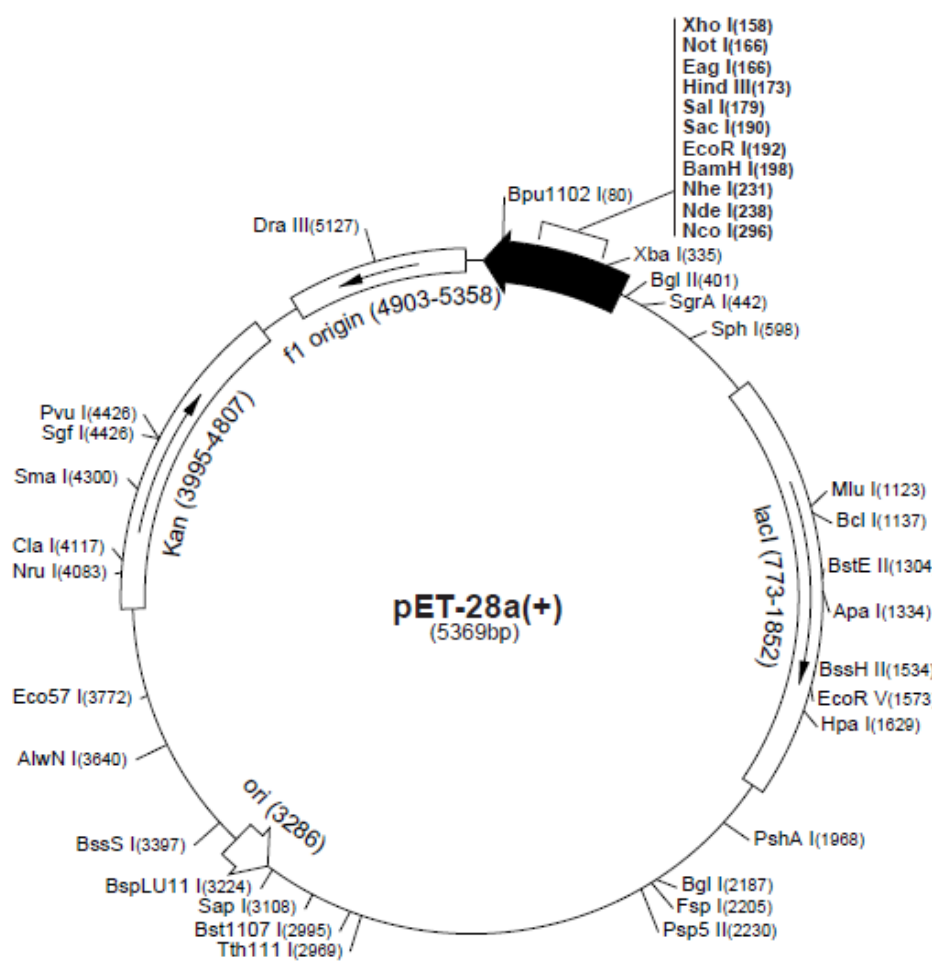
F^l endA₁ (lacZYA-argF) U169(m80lacZ ΔM15) re(A₁ hsdR 17rk-mkt)SUPE 44 thi-l rec A₁ gy Ac (Nalv)rel A₁ Δ

سویه مورد نظر مشتق از سویه *DH1* باکتری *E.coli* می‌باشد و یکی از مهمترین ویژگی‌های آن بالا بودن قابلیت تراریختگی آن است. این باکتری که بر روی اپران Lac خود دارای جهش بوده و اجازه‌ی فعالیت اندونوکلازها را برای از بین بردن ژن خارجی نمی‌دهد به عنوان میزبان برای همسانه - سازی در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. سویه‌ی *BL21 (DE3)* در این پژوهش به عنوان میزبان اختصاصی برای بیان ژن همسانه‌شده استفاده شد. این باکتری سویه‌ای از *E.coli* است که در ژنوم خود حاوی قطعه‌ی ژنی *DE3* می‌باشد. این قطعه مشتقی از فاژ λ است که ناحیه ایمنی فاژ ۲۱ را داراست. همچنین *BL21 (DE3)* حامل قطعه DNA ای است که حاوی ژن *lacUV5 promoter* می‌باشد که کنترل کننده رونویسی *T7 RNA polymerase* می‌باشد. همچنین این سویه، کدکننده‌ی tRNA بارگیری‌کننده برای کدون‌های نادر اسیدآمینه‌های آرژنین، ایزولوسین، پرولین و گلايسین می‌باشد. در سویه *DE3* پروموتر *lacUV5* در حضور IPTG/القاء شده، رونویسی از ژن رمزدهنده‌ی *T7 RNA Polymerase* را پیش می‌برد و نتیجتاً رونویسی این آنزیم، سبب فعال‌شدن *T7 promotor* در پلازمید نو ترکیب و بیان پروتئین خواهد شد (Novagen ۲۰۰۵).

¹ Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

۲-۲- پلازمید مورد استفاده در پژوهش

پلازمید $pET-28a(+)$ که به عنوان حامل همانندسازی در این پژوهش استفاده شد، از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهیه و دارای ۵۳۶۹ جفت باز می باشد. اضافه کردن توالی های هیستیدینی به انتهای N و انتهای C پروتئین از ویژگی های این سری از پلازمیدهای pET می باشد. علاوه بر این، پلازمید حاوی پروموتور T7 می باشد. منشاء f1 جهت تولید DNA تک رشته ای حاصل از ناحیه همسانه سازی بیان با کمک آلودگی با فاز کمی تعبیه شده است و تعیین توالی تک رشته با استفاده از پرایمر خاتمه T7 امکان پذیر خواهد بود. این پلازمید دارای ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کانامیسین بوده و دارای جایگاه های برشی کلونینگ، بیان متعدد نیز می باشد که در شکل به آنها اشاره شده است (Novagen, 2005).



شکل ۲-۱ نقشه حلقوی پلازمید pET-28a و جایگاه های برش آن (Novagen, 2005)

۲-۳-۳- تکثیر قطعه‌ی ژنی

قطعه‌ی ژنی اندوزایلاناز با استفاده از آغازگرهای طراحی شده طی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و طبق مراحل زیر تکثیر یافت.

۲-۳-۳-۱- آماده‌سازی آغازگرهای PCR و شرایط انجام PCR

آغازگرها به صورت لیوفیلیزه بودند که با افزودن مقادیر مشخص شده آب به توصیه شرکت سازنده به غلظت ۱۰۰ میکرومولار رسانده و به عنوان محلول اصلی در نظر گرفته شد، سپس از این محلول رقت ۱۰ میکرومولار (۱۰ پیکومول بر میکرولیتر از هر یک) تهیه و به عنوان محلول کاری استفاده گردید.

تهیه مخلوط واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر که حجم هر کدام از مواد مورد نیاز در (جدول ۲-۲) آمده است.

تنظیم برنامه‌ی زمانی چرخه‌های واکنش که در جدول آمده است:

(۱) واسرشت سازی^۱: مخلوط تا ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد حرارت داده شد. این دما پیوندهای هیدروژنی نگهدارنده دورشته‌ی DNA را می‌شکند و باعث واسرشت‌سازی مولکول می‌گردد.

(۲) اتصال^۲: مخلوط تا دمای ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد خنک شد. در این دما دو آغازگر در محل‌های ویژه‌ای به مولکول DNA اتصال می‌یابند.

(۳) بسط^۳: دما تا ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد افزایش یافت. در این مرحله، آنزیم DNA پلیمراز Taq به هر آغازگر چسبیده و رشته‌های جدیدی از DNA مکمل الگو را تشکیل می‌دهد.

به منظور تأیید انجام واکنش، ۴ میکرولیتر از محصول واکنش در ژل آگارز ۱ درصد و بافر TAE با ولتاژ ۸۰ به مدت ۳۵ دقیقه الکتروفورز گردید.

^۱ denaturation

^۲ annealing

^۳ extension

جدول ۲-۲: مواد مورد نیاز برای انجام واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر

مواد مورد نیاز	حجم (میکرولیتر)
Master mix حاوی آنزیم Taq polymerase، منیزیم کلرید، دئوکسی ریبونوکلوئید، آنزیم	۹
آب مقطر دیونیزه استریل	۸
آغازگر رفت و برگشت	۱+۱
الگو	۱

جدول ۲-۳: برنامه ی چرخه ی مورد استفاده در واکنش PCR

مراحل واکنش	واسرشت سازی	اتصال	بسط
واسرشت سازی اولیه	۵ دقیقه، ۹۵°C	-	-
چرخه ۱ تا ۳۰	۴۵ ثانیه، ۹۴°C	۴۵ ثانیه، ۵۶°C	۷۲°C، ۹۰ ثانیه
بسط نهایی	-	-	۷۲°C، ۱۰ دقیقه

۲-۳-۴- تخلیص باند اختصاصی قطعه ی ژنی از روی ژل آگار

واکنش PCR ممکن است حاوی محصولات غیراختصاصی باشد، همچنین مواد موجود در محلول واکنش مانع عملکرد آنزیم های مراحل بعدی می شود، بنابراین نیاز به تخلیص باند اختصاصی قطعه ژنی از روی ژل آگارز می باشد. محصول PCR انجام شده به حجم ۸۰ میکرولیتر بر روی ژل آگارز ۰/۹ درصد برده شده و باند اختصاصی از روی ژل با استفاده از Geneall PCR purification kit طبق دستورالعمل شرکت سازنده تخلیص شد. برای سنجش میزان غلظت DNA تخلیص شده، ۴ میکرولیتر از آن روی ژل آگارز ۰/۹ درصد و بافر TAE با ولتاژ ۸۰ به مدت ۳۵ دقیقه الکتروفورز گردید و باقیمانده به منظور استفاده در مراحل بعدی در دمای ۲۰- درجه ی سانتی گراد نگهداری شد. استخراج پلازمید *PET-28a*: استخراج پلازمید طبق دستورالعمل Geneall plasmid extraction kit انجام گرفت.

۲-۳-۵- هضم محصول و حامل *pET-28a*

واکنش هضم دوگانه‌ی آنزیمی برای محصول PCR و حامل *pET-28a* به صورت زیر انجام شد. آنزیم‌های *SalI* و *Fast digest EcoRI* دارای بافر اختصاصی می‌باشند، لذا واکنش هضم در حجم ۳۰ میکرولیتر مطابق با جدول (۲-۴) انجام پذیرفت.

جدول ۲-۴: ترکیبات واکنش هضم آنزیمی دوگانه

ترکیب	حجم (میکرولیتر)
DNA (حامل یا محصول PCR)	۲۲
بافر اختصاصی <i>SalI</i>	۲/۵
آنزیم <i>SalI</i>	۳
آنزیم <i>EcoRI</i>	۱/۵
بافر اختصاصی <i>Fast digest</i>	۱

این محتویات درون یک میکروتیوب ۰/۵ میلی‌لیتری ریخته شد و کاملاً مخلوط شد و به مدت ۶۰ دقیقه در حمام آب با دمای ۳۷ درجه ی سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. سپس به منظور غیر فعال سازی آنزیم‌ها، میکروتیوب در دمای ۸۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. چهار میکرولیتر از محصول هضم شده بر روی ژل آگارز ۰/۹ درصد و بافر TAE با ولتاژ ۸۰ به مدت ۳۵ دقیقه الکتروفورز گردید.

شرایطی مشابه طبق دستورالعمل زیر برای هضم حامل در نظر گرفته شد:

جدول ۲-۵: هضم آنزیمی دوگانه

ترکیب	حجم (میکرولیتر)
PET-28a	۸
بافر اختصاصی <i>SalI</i>	۲
آنزیم <i>SalI</i>	۲
آنزیم <i>EcoRI</i>	۱
بافر اختصاصی <i>Fast digest</i>	۲
آب دیونیزه	۵

آنزیم‌ها و بافر موجود در محصول هضم مانع فعالیت آنزیم مرحله‌ی بعد می‌شوند، بنابراین نیاز به تخلیص محصول حاصل از هضم آنزیمی است. برای این منظور از Geneall PCR purification kit طبق روش شرکت سازنده استفاده شد.

۲-۳-۶- انجام واکنش اتصال

پس از تخلیص، قطعه‌ی ژنی و حامل برش داده شده توسط دو آنزیم آماده برای واکنش اتصال گردید. به منظور دستیابی به بیشترین کارایی در الحاق می‌بایستی غلظت مولی قطعه‌ی ژنی نسبت به حامل بین ۲ تا ۵ برابر باشد. با توجه به مقایسه غلظت حامل و ژن، دو ترکیب زیر با دو مقدار برای واکنش الحاق در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد (جدول ۲-۶).

جدول ۲-۶: ترکیب واکنش اتصال

ترکیب	حجم (میکرولیتر)
ناقل هضم و تخلیص شده pET-28a	۱/۵
قطعه‌ی ژنی تخلیص شده	۴/۵
بافر ویژه آنزیم لیگاز	۱
ddH ₂ O	۲/۵
آنزیم T4 DNA Ligase	۰/۵

واکنش اتصال به مدت ۲۰ دقیقه و در ۲۲ درجه انجام گردید.

۲-۳-۷- تهیه سلول‌های مستعد

تهیه‌ی سلول‌های مستعد مطابق با دستورالعمل موجود طبق روش زیر انجام شد:

- ۱- یک کلنی از باکتری در ۱۰ میلی‌لیتر محیط LB (پیوست، جدول ۱۱) در یک فالكون ۵۰ میلی‌لیتری تلقیح و به مدت یک شب در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد گرماگذاری شد.
- ۲- یک میلی‌لیتر از کشت تازه در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB (در ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری) تلقیح شدند.

۳- بعد از حدود یک ساعت و ۳۰ دقیقه OD (چگالی نوری) باکتری‌های محیط کشت به OD برابر ۵/۰ تا ۸/۰ رسید که از این زمان به بعد تمام مراحل روی یخ و در کنار شعله انجام گرفت. در این هنگام تمام محیط کشت به چهار فالكون ۵۰ میلی لیتری استریل منتقل شد (۲۵ میلی لیتر محیط کشت در هر فالكون ریخته شد) و به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰rpm و دمای ۴°C سانتریفیوژ انجام شد و مایع رویی دور ریخته شد.

۴- رسوب حاصل با اضافه کردن مقداری $CaCl_2$ (۱۰۰ میلی مولار) پیپتاژ شده و در آخر به حجم ۲۵ میلی لیتر رسانده شده و به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ انجام شد و مایع رویی حذف شد.

۵- رسوب حاصل در چهار فالكون با اضافه کردن چند میلی لیتر از $MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار) حل و پیپتاژ شده و سپس محتویات ۴ فالكون به ۲ فالكون تبدیل شد و در نهایت حجم هر کدام از ۲ فالكون باقیمانده به ۲۵ میلی لیتر رسید و ۳۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۵۰۰ rpm سانتریفیوژ انجام شد و مایع رویی حذف شد.

۶- رسوب حاصل در دو فالكون با اضافه کردن چند میلی لیتر از $CaCl_2$ (۱۰۰ میلی مولار) حل شده و سپس محتویات ۲ فالكون به یک فالكون تبدیل شد و در نهایت حجم نهایی به ۲۵ میلی لیتر رسید و ۱۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۵۰۰rpm سانتریفیوژ انجام گردید و مایع رویی حذف شد.

۷- رسوب حاصل در ۱/۵ میلی لیتر $CaCl_2$ به همراه گلیسرول ۱۵ درصد کاملاً استریل و اتوکلاو شده حل شد و در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری استریل، ۱۰۰ میکرولیتر از آن ریخته شد و در دمای ۷۰°C قرار داده شد.

۲-۳-۸- تراریخته کردن محصول اتصال درون باکتری مستعد $DH5\alpha$ با استفاده از روش شوک

حرارتی

تراریخته کردن محصول اتصال، به صورت زیر انجام شد:

- ۱- از محصول اتصال به میزان ۱۰ میکرولیتر به ۵۰ میکرولیتر از سلول‌های مستعد اضافه شد و ۳۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. به میکروتیوب کنترل مثبت نیز پلازمید غیر نو ترکیب افزوده شد.

۲- سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد در بن ماری گرماگذاری شد، سپس بلافاصله به مدت سه دقیقه روی یخ قرار گرفت.

۳- ۷۰۰ میکرولیتر از محیط کشت LB به سلول‌ها اضافه شد و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه-ی سانتی‌گراد گرماگذاری انجام شد.

۴- پس از گرماگذاری، ترکیب سلول و محیط کشت به مدت سه دقیقه در ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد، سپس ۵۵۰ میکرولیتر از مایع رویی دور ریخته شده و ۲۰۰ میکرولیتر باقی مانده به همراه رسوب پیپتاژ شده، بر روی محیط کشت جامد LB آگار (پیوست، جدول ۱۲) حاوی کانامایسین (۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) منتقل و بعد از پخش بر روی پلیت به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرماگذاری شدند.

۲-۴- انتخاب کلنی‌های نوترکیب

حامل *pET-28a* دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین می‌باشد، به همین دلیل تنها باکتری‌هایی که موفق به دریافت این حامل در مرحله تراریزش شدند، توانستند در محیط کشت دارای آنتی‌بیوتیک کانامایسین رشد کنند. در ادامه با استفاده از روش‌های دقیق‌تر، کلون‌های مورد نظر از لحاظ صحت تراریخت شدن و دریافت توالی مورد نظربرسی شدند. در این مرحله تأیید کلنی‌های نوترکیب اولیه ابتدا با استفاده از روش Colony PCR– Quick Check و هضم آنزیمی به ترتیب و شرح زیر انجام شد.

۲-۴-۱- روش Quick check یا استخراج با فنل و کلروفرم

۱- کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین انتخاب و به صورت چمنی بر روی پلیت LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شدند و ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. همزمان یک کلنی از سویه‌ی *DH5α* واجد حامل *pET-28a* (کنترل) نیز کشت داده شد.

- ۲- بعد از رشد باکتری‌ها با استفاده از آنس، مقداری از کلنی‌های رشد کرده برداشته و در ۸۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد (در کنار شعله و زیر هود).
- ۳- در هر میکروتیوب به میزان ۵۰ میکرولیتر فنل و ۵۰ میکرولیتر ترکیب کلروفرم: ایزوآمیل الکل با نسبت (۱:۲۴) اضافه و توسط ورتکس به خوبی مخلوط شدند.
- ۴- محلول بدست آمده به مدت پنج دقیقه با دور ۵۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید و سپس فاز بالایی که حامل پلازمید است به منظور الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۹ درصد در کنار نمونه‌ی کنترل بارگذاری شد.
- ۵- پلازمیدهای نو ترکیب نسبت به پلازمید کنترل سنگین‌تر بوده و در نقطه‌ی بالاتری در ژل قرار گرفته خواهند شد.

۲-۴-۲ روش Colony PCR

کلون‌های مثبت مشاهده شده در روش بالا به صورت زیر با روش Colony PCR مورد تایید مجدد قرار گرفتند که مراحل انجام مشابه با PCR اولیه بوده با این تفاوت که از کلنی‌های مشاهده شده به عنوان الگو استفاده میشود.

۲-۴-۳ استخراج پلازمید و هضم آنزیمی

از کلنی‌های تایید شده به روش Colony PCR و Quick check استخراج پلازمید به وسیله Gene all plamid extraction kit صورت گرفته و توسط هضم آنزیمی دوگانه مورد تایید نهایی قرار گرفتند. با توجه به نتایج حاصل و تایید نهایی، پلازمید آماده‌ی انتقال به سویه بیانی گشت.

۲-۵- انتقال پلازمید نو ترکیب به باکتری *E.coli BL21 (DE3)*

در این مرحله حامل نو ترکیب به میزبان بیانی یعنی *E.coli Rosetta (DE3)* منتقل گردید. مراحل انجام گرفته عبارت بود از:

الف) مستعد سازی *E.coli BL21 (DE3)*

ب) تخلیص حامل نو ترکیب از باکتری $DH5\alpha$ با استفاده از کیت استخراج پلازمید

ج) تراریخته کردن حامل نو ترکیب به میزبان بیانی

تمام این مراحل مشابه انتقال پلازمید به $DH5\alpha$ در مرحله قبل انجام گرفت. در نهایت کلنی های نو ترکیب انتخاب شده و به منظور بررسی بیان ژن کشت داده شدند.

۲-۵-۱- بیان پروتئین

به منظور بیان پروتئین در باکتری مراحل زیر انجام شد:

- ۱- یک کلنی از کلنی های مثبت، در پنج میلی لیتر محیط کشت LB دارای کانامایسین (در یک فالكون ۵۰ میلی لیتری) تلقیح و در دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد به مدت یک شب گرماگذاری شد.
- ۲- ۲ سی سی از کشت تازه باکتری در ۲۰۰ میلی لیتر محیط کشت LB (در ارلن ۱۰۰۰ میلی لیتری) تلقیح شد.

۳- در جذب نوری ۱ به محیط کشت به مقدار ۱ میلی مولار IPTG اضافه شد. محیط کشت در دمای ۴۰ درجه ی سانتی گراد و دور ۱۸۰ rpm به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری گردید و به منظور آماده سازی نمونه ها برای SDS-PAGE مراحل زیر انجام شد:

- ۱- ۱ میلی لیتر از نمونه ی تهیه شده در ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس رسوب حاصل از سوپ جدا و بعد از حل شدن در بافر فسفات با pH ۸ با بافر مخصوص SDS-PAGE مخلوط گردید و ۱۰ دقیقه جوشانده شد تا عمل دناتوراسیون اتفاق بیفتد و نهایتاً رسوب حاصل در ژل اکریل آمید با ولتاژ ثابت ۸۵ الکتروفورز گردید.

۲-۵-۲- الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات

برای تفکیک و تعیین وزن مولکولی پروتئین ها از ژل پلی آکریل آمید SDS، ۱۰ درصد استفاده شد. این ژل حاوی دو غلظت متفاوت از اکریل آمید است (پیوست، جدول ۳ و ۴). برای انجام الکتروفورز از دستگاه BIO-RAD و دستورالعمل های مربوطه استفاده شد. ابتدا شیشه هایی که برای ساختن ژل به کار می رفتند شسته شده و سطح آنها با الکل ۷۰ درصد کاملاً پاک گردید. سپس شیشه ها روی هم

قرار گرفته و در چهارچوب‌های مخصوص جای‌گذاری شدند. پس از اطمینان از عدم وجود نشی با پرکردن فضای بین شیشه‌ها از آب مقطر، ابتدا ژل جداکننده^۱ ریخته شد و با استفاده از سمپلر سطح رویی ژل با آب مقطر پر گردید تا از ورود هوا به درون ژل جلوگیری شود و همچنین سطح ژل کاملاً صاف گردد. بعد از ۱۰ الی ۱۵ دقیقه ژل به خوبی بسته شد. پس از آن، از طریق وارونه کردن قاب، آب مقطر خارج و سپس ژل متراکم‌کننده^۲ اضافه شد و بلافاصله شانه در محل مناسب قرار گرفت. پس از اطمینان از بسته شدن ژل‌ها، شانه خارج و قالب شیشه‌ای به تانک الکتروفورز متصل گردید، مخزن تا ارتفاع مناسب با بافر الکتروفورز پر شد (پیوست، جدول ۵). در نهایت ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌ها در چاهک‌های ژل SDS-PAGE ریخته شد و با شدت ولتاژ ۸۵ ران گردید. نشانگر پروتئین نیز در یکی از چاهک‌ها بارگذاری شد. بعد از رسیدن رنگ به انتهای ژل، شدت جریان قطع و ژل‌ها از تانک خارج شده، سپس رنگ آمیزی ژل به وسیله رنگ کوماسی بلو انجام شد.

۲-۶- سنجش فعالیت Crude enzyme (آنزیم خالص نشده)

با توجه به قابل رویت نبودن بیان آنزیم در ژل SDS PAGE و اطمینان از حضور پروتئین سنجش فعالیت آنزیم با استفاده از *oat spelt xylan* به عنوان سوبسترا بر روی سوپ حاصل از شکست باکتری انجام شد. برای این منظور مخلوط ۴ میکروگرم از سوبسترا در بافر سیترات با pH ۷ (پیوست، جدول ۹ و ۱۰) تهیه شد.

شکست باکتری با دستگاه اولتراسونیک^۳

پس از آماده شدن نمونه بیان، ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی باکتری به مدت ۲۰ دقیقه با ۸۰۰۰g در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد. پس از دور ریختن محلول رویی، رسوب باکتری در ۵ میلی‌لیتر بافر لیزکننده (جدول ۲-۷) حل شد و به مدت ۴۵ دقیقه درون یخ قرار گرفت.

سپس سونیکاسیون با قدرت ۷۰ درصد و ۰/۵ پالس در دقیقه، در شش چرخه‌ی زمانی، هر کدام شامل ۴۵ ثانیه سونیکاسیون و ۱ دقیقه استراحت، درون یخ انجام شد و سلول‌های باکتری از طریق نیروی امواج مافوق صوت شکسته شدند. محلول به دست آمده، بلافاصله به مدت ۲۰ دقیقه با ۸۰۰۰g

^۱ Resolving gel

^۲ Sracking gel

^۳ Ultrasonication

در دمای 4°C سانتریفیوژ شد و محلول رویی به منظور انجام مراحل بعدی، شامل خالص سازی و سنجش فعالیت پروتئین، در دمای 4°C نگهداری شد. از محلول رویی و رسوب حاصل از سونیکاسیون SDS PAGE گذاشته شد.

جدول ۲-۷: ترکیبات بافر لیزکننده

غلظت	ترکیبات
۵۰ میلی مولار	NaH_2PO_4
۳۰۰ میلی مولار	NaCl
۱۰ میلی مولار	ایمیدازول
۰/۰۵ درصد	توئین ۲۰
pH نهایی بافر: ۸	

سنجش فعالیت آنزیم طبق مراحل زیر انجام گرفت:

۱- ۸۰ میلی لیتر از رسوب محیط کشت که مورد شکست سلولی^۱ قرار گرفته بود برداشته و با ۲۰ میکرولیتر از سوبسترا مخلوط گردید و به مدت ۵ دقیقه در 42°C درجه قرار داده شد. (عدد به صورت تجربی به دست آمده است)

۲- به منظور بلانک از دو باکتری *BL21* و *BL21* حاوی پلازمید غیرنو ترکیب استفاده شد. برای توقف واکنش به هر ۳ نمونه به مقدار ۳ برابر حجمشان یعنی ۳۰۰ میکرولیتر محلول DNS (دی نیترو سالیسیلیک اسید) اضافه گردید (برای اندازه گیری مقدار OD مایع داخل کووت مورد استفاده می بایست به میزان ۴۰۰ میکرولیتر پر شود تا بتوان OD مایع داخل آن را با دستگاه اسپکتروفتومتر خواند) و نمونه ها ۱۰ دقیقه جوشانده شدند. در صورت فعالیت آنزیم، تغییر رنگ DNS بعد از جوشاندن نسبت به نمونه ی کنترل، حاکی از حضور قندهای احیاکننده در واکنش و فعالیت داشتن آنزیم می باشد.

۴- جذب نوری^۲ محلول حاوی آنزیم (با طول موج ۵۴۰ نانومتر) با صفر کردن دستگاه با هر دو نمونه ی کنترل خوانده شد.

¹ Sonication

² optical density

۷-۲- رسم منحنی استاندارد زایلوز

برای تبدیل OD های خوانده شده به فعالیت آنزیم از این نمودار استفاده می‌شود. بدین منظور از زایلوز رقت‌های مختلف شامل ۰/۲ mg/ml - ۰/۴ mg/ml - ۰/۶ mg/ml - ۰/۸ mg/ml و ۱ mg/ml تهیه شده و به آنها به اندازه‌ی ۳ برابر حجمشان DNS افزوده گردیده و ۱۰ دقیقه جوشانده شده و بعد از قرائت OD به صورت یک خط با معادله توسط نرم‌افزار Excell رسم گردید. در معادله‌ی $y = ax + b$ میزان جذب قرائت شده و X در معادله‌ی خط، میزان زایلوز را نشان می‌دهد. یک unit برابر است با مقداری از آنزیم که یک میکرومول از قندهای احیایی را در هر دقیقه آزاد می‌کند. در واقع عدد حاصل شده میلی گرم محصول در دقیقه بوده که باید به میکرومول در دقیقه تبدیل شود. (جهت تبدیل واحدها از نرم‌افزارهای آنلاین مانند: Metric conversion می‌توان استفاده نمود).

۱-۷-۲- تخلیص پروتئین در شرایط طبیعی

روش کار به این ترتیب است که:

- ۱- یک کلنی از کلنی‌های مثبت در ۱۰ میلی لیتر محیط کشت LB دارای کانامایسین در یک فالكون ۵۰ میلی لیتری تلقیح و به مدت ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد گرماگذاری شد.
- ۲- ۲ میلی لیتر از کشت تازه باکتری در ۲۰۰ میلی لیتر محیط کشت LB دارای کانامایسین (۵۰ میکرولیتر در هر میلی لیتر) تلقیح شد و ۲ ساعت در شیکرانکوباتور در ۳۷ درجه سانتیگراد با شیکر دور ۱۸۰ rpm گرماگذاری شد تا جذب نوری آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر به $OD=1$ برسد.
- ۳- به کشت، IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی مولار اضافه شد و در انکوباتور با دمای ۴۲ درجه سانتیگراد و دور ۱۸۰ به مدت ۴۸ گرماگذاری گردید.
- ۴- پس از گذشت ۴۸ ساعت، محیط کشت در دور ۳۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد.
- ۵- در این مرحله محلول رویی را جدا کرده و رسوب باقی مانده در ۸ میلی لیتر بافر لیز با pH ۸ حاوی (۵۰ میلی مولار Na_2Hpo_4 - ۳۰۰ میلی مولار $NaCl$ - ۱۰ میلی مولار $imidiazol$) حل شد.
- ۶- ۲۰ میلی گرم لیزوزیم برای کمک به هضم دیواره‌ی سلولی به محلول بالا اضافه گشته و ۳۰ دقیقه

در یخ قرار داده شد.

۷- سلول‌های باکتری در ۶ مرحله، هر کدام ۴۵ ثانیه توسط دستگاه سونیکاتور شکسته شد.

۸- تخلیص پروتئین نو ترکیب ۱ استفاده از ستون نیکل (*Ni-NTA Agarose*) شرکت (Qiagen USA) و طبق مراحل زیر انجام شد:

بعد از ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و جدا کردن سوپ حاوی آنزیم، شرایط برای تخلیص آماده می‌گردد. اما قبل از آن نیاز به آماده‌سازی ستون مورد نظر است که مراحل آن به شرح زیر انجام شد:

ابتدا ستون کروماتوگرافی نیکل به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر آماده شد و دو بار با آب مقطر (به اندازه ی حجم کل ستون شستشو داده شد و سپس برای به تعادل رساندن ستون از بافر اتصال به حجم ۲/۵ میلی‌لیتر (۵ برابر حجم ستون) استفاده شد. محلول حاوی آنزیم با ستون *Ni-NTA* به مدت ۳ ساعت درون Rotator در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس مورد مخلوط شدن قرار گرفت. افزایش زمان در این مرحله باعث برقراری اتصال بهتر هیستیدین پروتئین‌های نو ترکیب به ستون می‌شود. مراحل تخلیص به شرح زیر انجام شد:

۱- بعد از گذشت سه ساعت محلول حاوی رزین و آنزیم از روی ستون عبور داده شد.

در این مرحله پروتئین متصل شده به رزین روی ستون باقی مانده و بقیه محلول خارج می‌شود.

۲- در این مرحله از ۱۵ سی‌سی محلول شستشو استفاده می‌شود که حاوی مقادیر بیشتر ایمیدازول نسبت به بافر اتصال بوده و باعث شستشوی پروتئین‌های اضافی می‌گردد.

۳- در این مرحله از بافر خارج کننده که حاوی ۲۵۰ میلی مولار ایمیدازول است استفاده شد که در نهایت موجب خروج آنزیم تخلیص شده از ستون خواهد شد.

۲-۷-۲- دیالیز

دیالیز آنزیم خالص شده در بافر سیترات با pH ۷ و به منظور حذف نمک‌ها و ایمیدازول موجود در بافر خارج کننده انجام شد به گونه‌ای که بعد از قرار دادن آنزیم در کیسه دیالیز به مدت ۱۶ ساعت در بافر سیترات با pH ۷ و روی دستگاه magnetic Stirrer نمونه از کیسه خارج و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گشته و سوپ جدا شده برای انجام مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

۸-۲- تعیین غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد^۱

یکی از ساده‌ترین روش‌ها برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین در یک محلول استفاده از نور فرابنفش است. برای سنجش غلظت پروتئین از روش‌های رنگ‌سنجی مانند لوری^۲ و برادفورد استفاده می‌شود. روش برادفورد یک روش سریع و حساس است و براساس پیوند کوالانسی رنگ کوماسی بلو با پروتئین و تغییر مقدار جذب از ۴۶۵ به ۵۹۵ نانومتر طراحی شده است و سپس در طول موج ۵۹۵ نانومتر مقدار پروتئین ارزیابی می‌شود.

از مزایای این روش نسبت به روش لوری، عدم تداخل با یون‌های پتاسیم، منیزیم، *EDTA*، تریس، معرف‌های گوگردی و کربوهیدرات‌هاست؛ اما در حضور معرف‌های شدیداً قلیایی شدت رنگ افزایش پیدا می‌کند. همچنین حضور مقادیر بالایی از دترجنت‌ها در محیط با اندازه‌گیری پروتئین تداخل پیدا می‌کند (Bradford, 1976).

❖ روش کار

برای رسم منحنی استاندارد، غلظت‌های ۴۰، ۳۰، ۲۰، ۱۰، ۵ و ۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از سرم آلبومین به عنوان غلظت‌های استاندارد تهیه و ۲/۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد اضافه شد. هم‌چنین ۵۰ میکرولیتر از محلول پروتئینی در ۲/۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد حل شد. پس از ۱۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر، توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. سپس، با استفاده از نرم‌افزار *sigmaplot*، منحنی استاندارد غلظت پروتئین *BSA* برحسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر در مقابل جذب رسم گردید.

۸-۲-۱- تعیین دمای بهینه‌ی آنزیم

برای تعیین دمای بهینه برای حداکثر فعالیت آنزیم ابتدا ۲۰ میکرولیتر از سوپ حاوی آنزیم به همراه ۵ میلی‌گرم زایلان *oat spelt* در ۸۰ میکرولیتر بافر سیترات به عنوان سوسترا مخلوط گردیدند و در دماهای ۴-۱۶-۲۲-۲۸-۳۷-۴۲-۴۵-۵۰-۵۵-۶۰ درجه سانتی‌گراد به صورت شیکر به مدت ۵ دقیقه قرار گرفته و بعد از اضافه کردن ۳۰۰ میکرولیتر *DNS* و ۱۰ دقیقه جوشاندن، جذب نوری نمونه‌ها خوانده و نتایج توسط نرم‌افزار *SigmaPlot* مورد بررسی قرار گرفتند. (تمام واکنش‌ها در سه تکرار انجام پذیرفتند.)

¹ Bradford

² Lowry

۲-۸-۲- تعیین پایداری آنزیم در دماهای مختلف و به مدت ۹۰ دقیقه

بدین منظور ۲۰ میکرولیتر از آنزیم در دماهای ۴۰-۴۵-۵۰-۵۵-۶۰ درجه سانتی گراد قرار گرفته و هر ۵ دقیقه یکبار یک نمونه از همه دماهای یاد شده خارج گردیده و به آن سوبسترا اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در در شرایط بهینه قرار داده شد و جذب نوری هر کدام بعد از اضافه کردن *DNS* و جوشاندن به مدت ۱۰ دقیقه خوانده شد و داده‌های حاصله توسط نرم‌افزار SigmaPlot مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۹- تعیین pH بهینه برای حداکثر فعالیت آنزیم خالص

برای به دست آوردن pH بهینه برای فعالیت آنزیم از سه بافر سیترات فسفات برای pHهای ۳ تا ۷، بافر فسفات برای pHهای ۶ تا ۹ و بافر *Glycin-NaOH* برای pHهای ۹ تا ۱۰ استفاده گردید. بدین منظور ۵ میلی گرم زایلان *oat spelt* در هر کدام از بافرهای ذکر شده ساخته شد و به ۸۰ میکرولیتر از آن ۲۰ میکرولیتر آنزیم اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد و بعد از اضافه کردن ۳۰۰ میکرولیتر *DNS* (سه برابر حجم واکنش) و جوشاندن، جذب نوری آنها خوانده شد. نتایج حاصله توسط نرم‌افزار SigmaPlot مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۱۰- اثر ترکیبات شیمیایی بر فعالیت آنزیم

اثر یون‌های فلزی، پتاسیم، کلسیم، باریم، منیزیوم، کبالت، آمونیوم، روی، آهن، منگنز و مس در دو غلظت ۵ و ۱۰ میلی مولار و مهارکننده‌ها و دترجنت‌هایی همچون تریتون^۱، آمونیوم پراکسی دی سولفات^۲، سدیم دودسیل سولفات^۳، تووین^۴، دی تیو تریاتول^۵، *EDTA*^۶ و *PMSF*^۷ و حلال‌های آلی همچون متانول^۸، اتانول^۹، n-هگزان^{۱۰}، بوتانول^{۱۱}، دی متیل فرمامید^{۱۲}، گلیسرول^{۱۳}،

¹ Triton X-100

² ammonium peroxydisulfate

³ sodium dodecyl sulfate (SDS)

⁴ tween 80

⁵ Dithiothreitol (DTT)

⁶ Ethylenediaminetetraacetic acid

⁷ phenylmethylsulfonyl fluoride

⁸ Methanol

⁹ Ethanol

¹⁰ cyclohexane

¹¹ Butanol

¹² Dimethylformamide

¹³ Glycerol

کلروفرم^۱، استونیتریل^۲، ایزوپروپانول^۳، استون در دو غلظت ۱۰٪ و ۲۰٪ بر روی آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. (تمامی واکنش‌های آنزیمی در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر شامل ۲۰ میکرولیتر آنزیم و ۸۰ میکرولیتر بافر با جرم ۵ میلی گرم سوبسترا انجام پذیرفت).

۱۱-۲- بررسی فعالیت و پایداری آنزیم خالص در حضور نمک (سدیم کلرید)

فعالیت آنزیم در شرایط استاندارد واکنش و نیز پایداری آنزیم خالص در حضور غلظت‌های مختلف نمک (سدیم کلرید) تا ۵ مولار و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق مورد بررسی قرار گرفته‌شده و نتایج و نمودارها توسط نرم‌افزار SigmaPlot بررسی و رسم گردید.

۱۲-۲- بررسی فعالیت آنزیم در حضور دنا توره‌کننده اوره

فعالیت آنزیم در حضور مقادیر مختلف اوره و با توجه به ویژگی منحصر به فرد آنزیم مورد بررسی قرار گرفت و نتایج توسط نرم افزار SigmaPlot مصور گردید. تجهیزات و مواد مورد استفاده، انواع محلول‌ها و ترکیبات، بافرها و محیط کشت‌های تهیه‌شده در پیوست آورده شده‌است.

۱۳-۲- زایموگرام

به منظور بررسی فعالیت آنزیم بر روی سوبسترای *Oat spelt xylan* از زایموگرافی استفاده شد. مراحل آماده سازی و انجام واکنش به صورت زیر است:

در این روش برای حفظ فعالیت آنزیمی، احیاکننده‌ها همچون ۲- مرکاپتواتانول و یا SDS به کار برده نمی‌شود ولی اصول کلی عمل شبیه به روش الکتروفورز پروتئین با SDS-PAGE است با این تفاوت که به جای آب خالص، از آب حاوی *Oat spelt xylan* استفاده می‌شود. جهت انجام زایموگرام ابتدا ۴ ماکرو نمونه آنزیمی خالص بدون جوشاندن در ژل تزریق شد. نمونه را در ژل *Native-PAGE* حاوی *Oat spelt xylan* با ولتاژ ۸۵ لود گردید. زمان اتمام الکتروفورز حدود ۹۰

¹ Chloroform

² acetonitrile

³ isopropanol

دقیقه خواهد بود. سپس ژل را از تانک خارج کرده و پس از شستشوی ژل با آب مقطر، به مدت ۱۵ دقیقه در بافر سیترات فسفات با pH ۷ در سردخانه قرار داده شد که این کار سه بار تکرار شده و نهایتاً بار سوم به انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه منتقل گردید و پس از شستشو با آب مقطر با قرمز کنگو رنگ آمیزی گردیده و توسط نمک ۱ مولار رنگ بری شد. (تمام مراحل آزمایش به جز گرماگذاری پایانی در سردخانه انجام گرفت.)

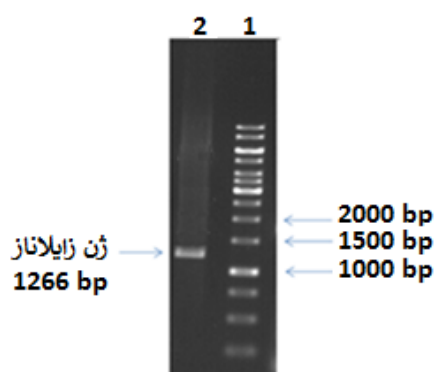
تجهیزات و مواد مورد استفاده، انواع محلول ها و ترکیبات، بافرها و محیط کشت های تهیه شده در پیوست آورده شده است.

فصل سوم

یافته‌های تحقیق

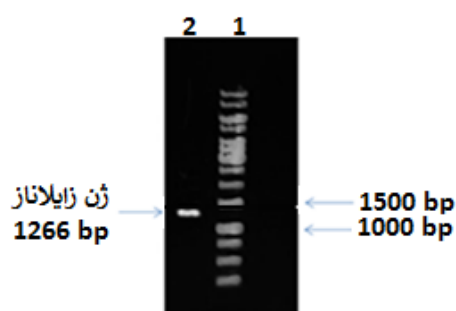
۱-۳- تکثیر و خالص سازی ژن GH11 (xylanase)

تکثیر ژن زایلاناز به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت انجام شد و باند اختصاصی ژن اندوزایلاناز قبل و بعد از خالص سازی در روی ژل آگارز ۰/۹٪ مشاهده گردید. لازم به توضیح است در هنگام طراحی آغازگرها جایگاه اختصاصی برای آنزیم‌های *EcoRI* و *SalI* در انتهای ۵ قرار داده شد بنابراین ژن تکثیر شده توسط این آغازگرها در دو انتهای خود دارای جایگاه برش اختصاصی برای این دو آنزیم می‌باشد. (شکل ۱-۳ و ۲-۳)



شکل ۱-۳: تکثیر ژن GH11 (xylanase)

چاهک (۱) مارکر DNA چاهک (۲) ژن زایلاناز

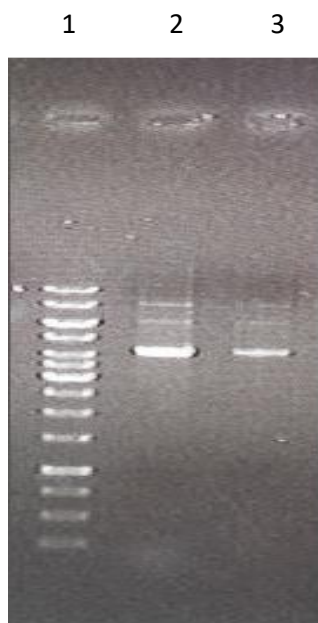


شکل ۲-۳: خالص سازی ژن GH11 (xylanase)

چاهک (۱) مارکر DNA چاهک (۲) ژن زایلاناز

۲-۳- استخراج پلازمید

پس از تهیه کشت تازه باکتری حاوی حامل *pET-28a* و استخراج پلازمید با کیت، باندهای حاصل بر روی ژل آگارز ۰/۹٪ درصد الکتروفورز و بررسی شد. (شکل ۳-۳)



شکل ۳-۳: استخراج پلازمید *PET-28a*

چاهک (۱) مارکر *DNA* چاهک ۲ و ۳) پلازمید *PET-28a*

۳-۳- هضم محصول PCR و حامل *pET-28a*

در این روش هر دو محصول به دست آمده مورد هضم آنزیمی همزمان دوتایی توسط دو آنزیم *EcoRI* و *SalI* قرار گرفتند که طی انجام واکنش حامل مورد نظر خطی شده و ۵۳۶۹ bp دیده شد. سپس هم قطعه‌ی ژنی و هم حامل توسط کیت با برند Geneall مورد تخلیص قرار گرفتند و برای عمل الحاق آماده شدند. عمل الحاق ژنی در حجم ۱۰ میکرولیتر و به مدت ۳۰ دقیقه انجام پذیرفت. (

شکل ۳-۴)

1 2 3

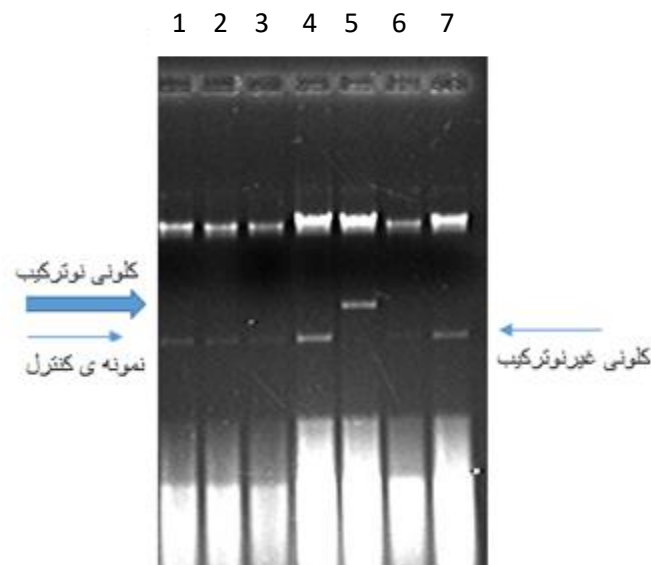


شکل ۳-۴: هضم آنزیمی دوگانه ژن و پلازمید

چاهک (۱) مارکر *DNA* چاهک ۲) پلازمید *PET-28a* و ۳) ژن زیلاناز

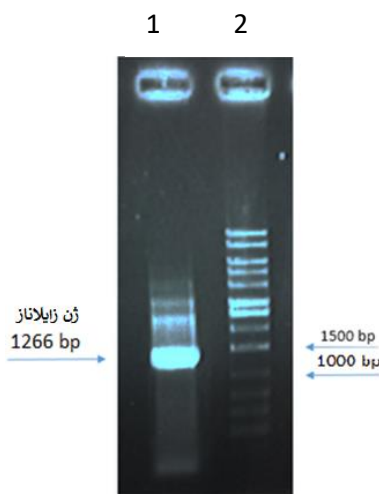
۳-۴- تایید نو ترکیبی

توسط روش quick check و Colony PCR: محصول حاصل از مرحله الحاق با استفاده از روش شوک حرارتی به داخل باکتری‌های مستعد *DH5α* تراریخته شد و سپس محصول حاصل بر روی پلیت LB آگار حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین کشت داده شد. به منظور تایید نو ترکیبی از روش PCR و Quick check استفاده گردید و نتایج روی ژل بررسی گردید. (شکل ۳-۵ و ۳-۶)



شکل ۳-۵: استخراج پلازمید به روش Quick check

چاهک (۱) نمونه‌ی کنترل-چاهک‌های ۲ تا ۴، ۶ و ۷ کلنی‌های غیرنو ترکیب- چاهک (۵) کلنی نو ترکیب

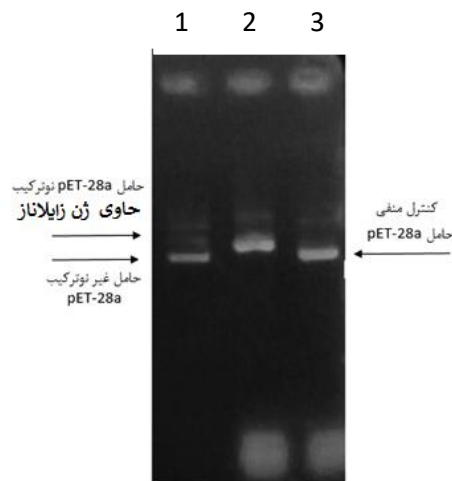


شکل ۳-۶: Colony PCR به منظور تایید کلنی مثبت

چاهک (۱) ژن زیلاناز - چاهک (۲) مارکر DNA

۳-۵- تایید نهایی توسط استخراج پلازمید و هضم آنزیمی

پلازمید نوترکیب تایید شده توسط روش های ذکر شده در نهایت توسط برش آنزیمی توسط دو آنزیم *EcoRI* و *SalI* مورد تایید قرار گرفت. (شکل ۳-۷ و شکل ۳-۸)



شکل ۳-۷: استخراج پلازمید از راست

چاهک های ۱ و ۳) نمونه کنترل منفی (حامل غیر نوترکیب)، چاهک ۲) حامل نوترکیب حاوی ژن



شکل ۳-۸: هضم آنزیمی دوگانه با دو آنزیم *EcoRI* و *SalI* و خروج ژن همسانه شده

چاهک ۱) ژن زایلاناز و پلازمید *PET-28a* - چاهک ۲) مارکر DNA

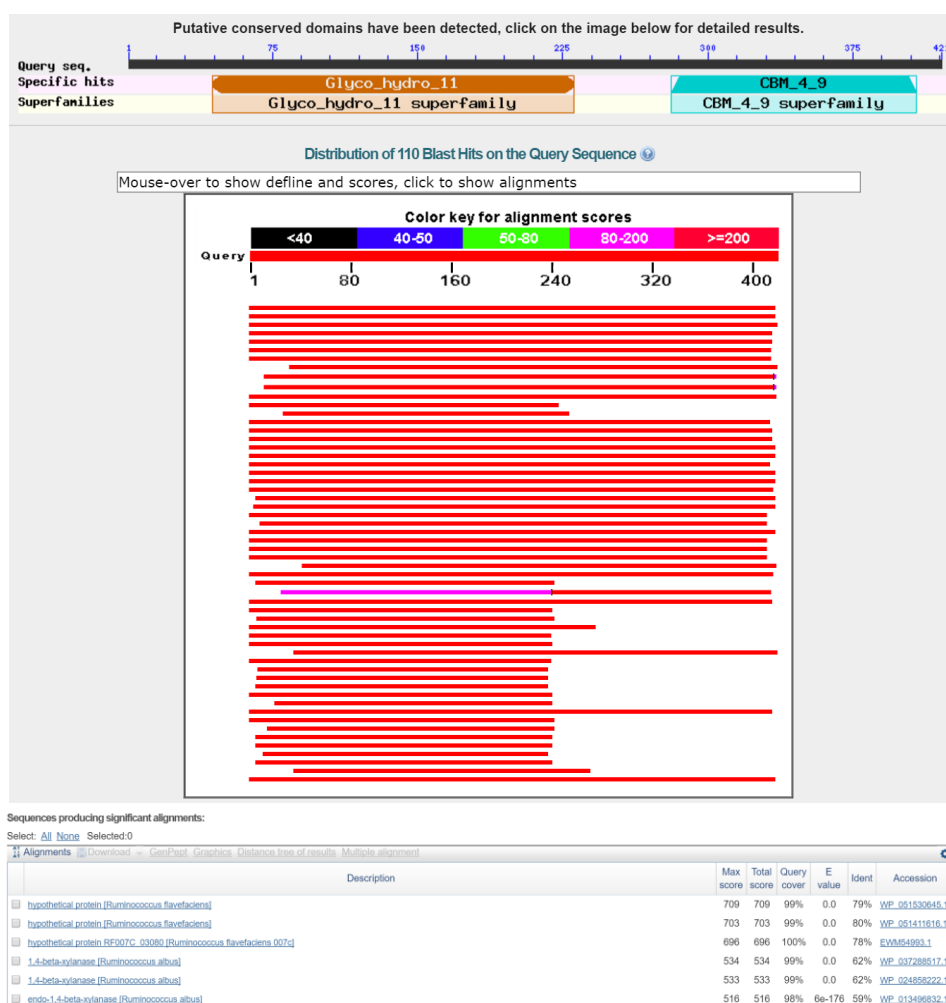
انتقال حامل نوترکیب به میزبان بیانی و تایید همسانه سازی بعد از تایید نوترکیبی، پلازمید استخراج شده به سویه ی مستعد *BL21* انتقال یافت و به منظور تایید همسانه سازی بار دیگر استخراج پلازمید از کلنی های رشد کرده در محیط LB آگار و حاوی کانامایسین انجام شد.

۳-۶- مطالعات بیوانفورماتیکی

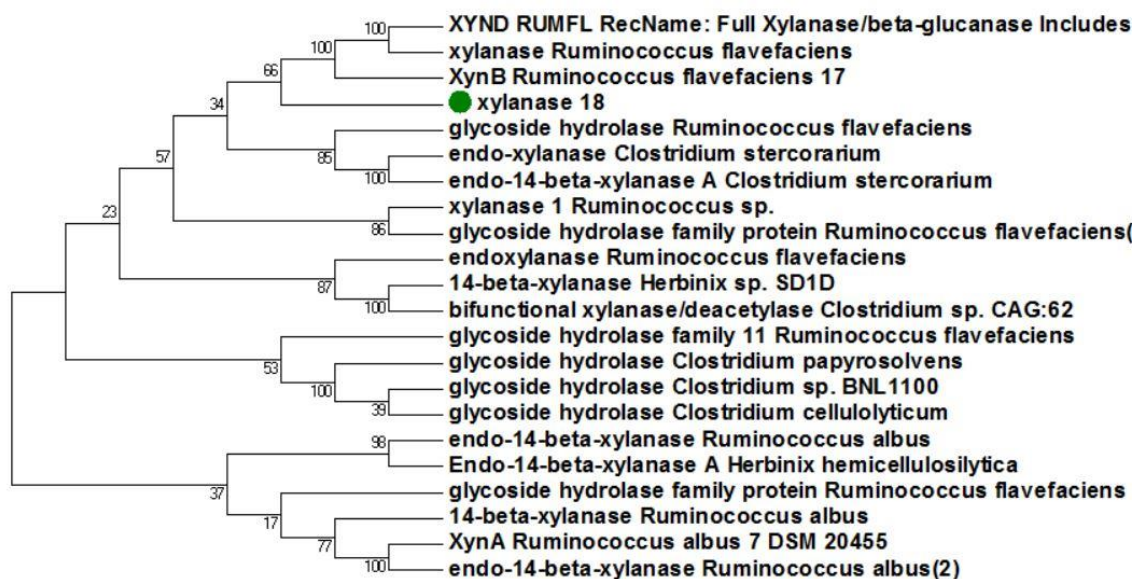
توالی ژنی مورد مطالعه حاوی ۱۲۶۶ جفت باز است. توالی حاصل با استفاده از نرم افزار BLAST در پایگاه اینترنتی NCBI مورد بررسی قرار گرفت. BLAST پروتئینی توالی مورد نظر فقط توسط ۹۹ درصد از نزدیک ترین توالی های شناسایی شده ی موجود پوشش داده شد و نزدیک به ۶۲٪ درصد شباهت به آن نشان داد. (شکل ۳-۹)

همچنین با رسم درخت فیلوژنی، نزدیکی آنزیم خود را با آنزیم های متعلق به منابع دیگر را به وسیله ی نرم افزار Mega 7 سنجش نمودیم (شکل ۳-۱۰)

مدل سازی آنزیم *GH11 endoxylanase* توسط نرم افزار Raptor x جهت درک بهتر ساختار فضایی و جایگاه های کاتالیتیکی احتمالی آن انجام گرفت. (شکل ۳-۱۱)

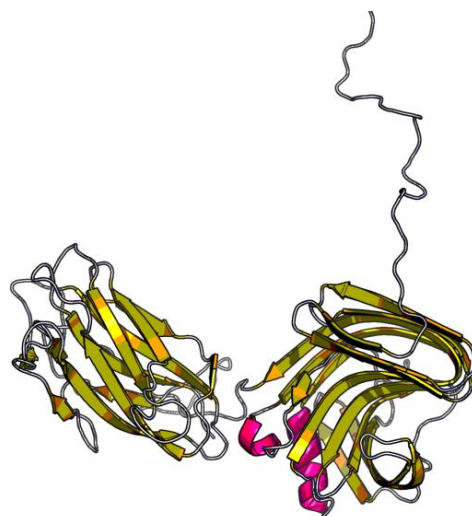


شکل ۳-۹: BLAST پروتئینی توالی ژن زایلاناز



شکل ۳-۱۰: درختچه‌ی فیلوژنی آنزیم زایلاناز استخراج شده از متازنوم شکمبه‌ی شتر با استفاده از نرم-

افزار Mega 7



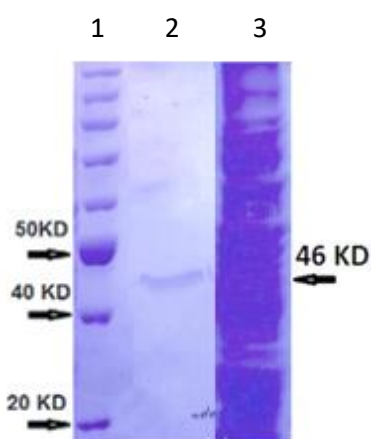
شکل ۳-۱۱: مدل‌سازی آنزیم *GH11 endoxylanase* توسط Raptor x

۳-۷- خالص‌سازی آنزیم زایلاناز

خالص‌سازی آنزیم توسط ستون نیکل سفارز انجام و الکتروفورز آن بر روی *SDS-PAGE* صورت

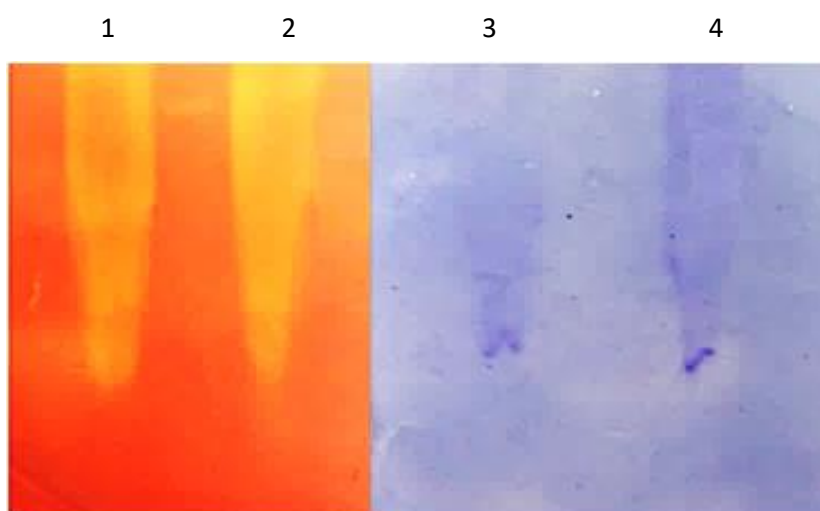
گرفت. باند پروتئین نزدیک به ۴۶ کیلودالتون قرار دارد. در این روش‌ها می‌توان اندازه پروتئین مورد

نظر را نیز تخمین زد. (شکل ۳-۱۲ و شکل ۳-۱۳)



شکل ۳-۱۲: SDS-PAGE آنزیم تخلیص شده

(۱) مارکر - (۲) آنزیم خالص و غلیظ شده - (۳) سوپ باکتری



شکل ۳-۱۳: زایموگرام در سمت چپ (رنگ آمیزی با کنگو رد) و در سمت راست Native-PAGE

۱ و ۲) اثر آنزیم روی محیط کنگورد ۳ و ۴) فعالیت آنزیم در ژل Native-PAGE

۳-۸ - بررسی فعالیت آنزیم

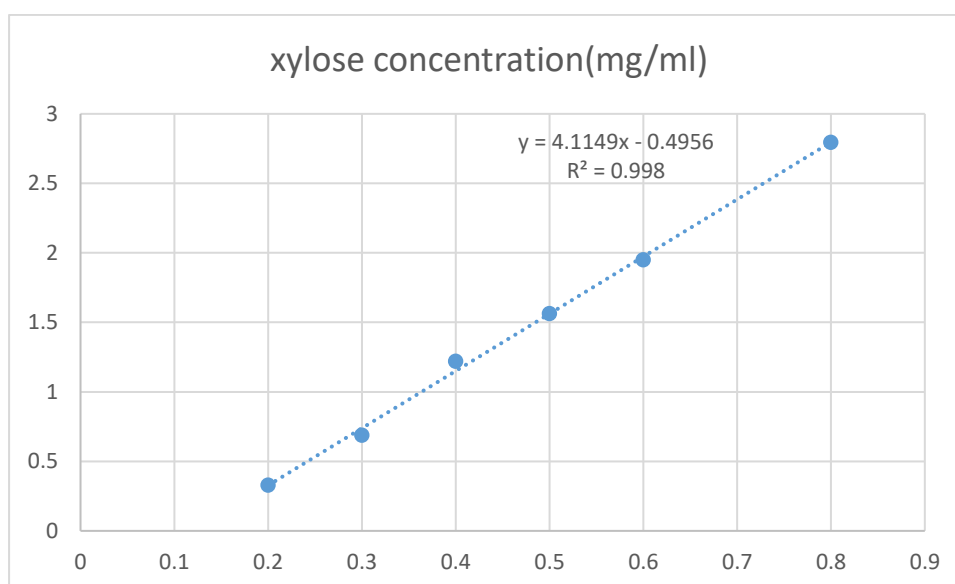
بعد از بیان پروتئین به منظور بررسی ویژگی‌های آن فعالیت آن بر روی سوبسترای خود یعنی *oat spelt xylan* مورد آزمایش قرار گرفته شد و تغییر رنگ حاصله می‌تواند دال بر فعالیت آنزیم و آزاد شدن قندهای کوچکتر باشد که تغییر رنگ مشاهده گردید. (شکل ۳-۱۴)



شکل ۳-۱۴: سنجش فعالیت آنزیمی از سمت راست : ۱- سوپ باکتری دارای حامل نو ترکیب بعد از شکست سلولی (نمونه خالص نشده). ۲- نمونه ی کنترل (باکتری حاوی حامل غیرنو ترکیب). ۳- آنزیم خالص شده

۳-۹- بررسی فعالیت آنزیم با استفاده از منحنی استاندارد زایلوز

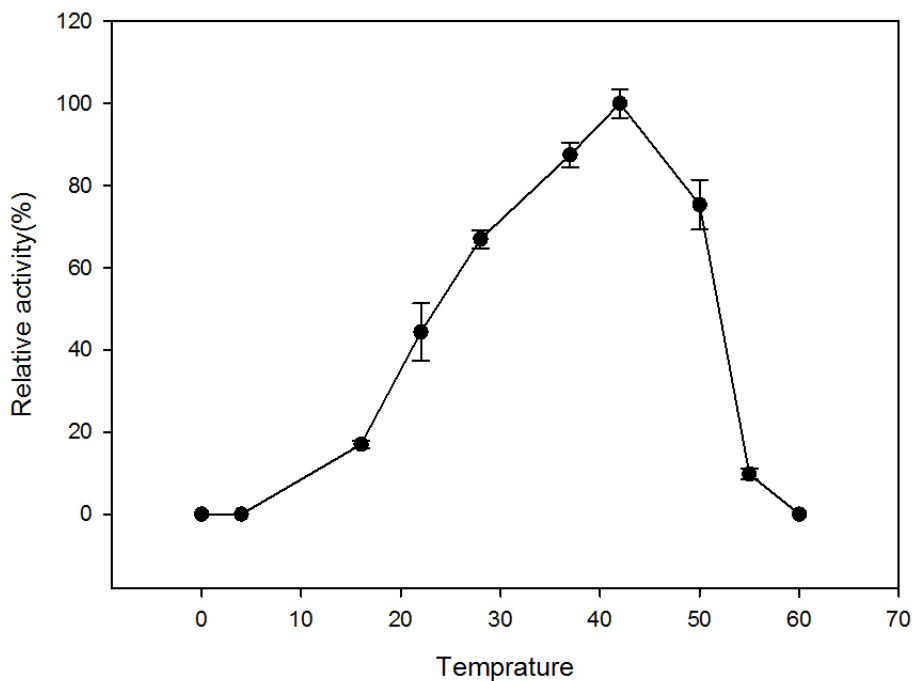
از آنجا که آنزیم زایلاناز با تجزیه ی سوپسترای خود قند احیا کننده آزاد می کند که در طول موج ۵۴۰ نانومتر جذب نوری دارد. بنابراین برای تبدیل OD خوانده شده به فعالیت آنزیم بر حسب Unit از منحنی استاندارد زایلوز استفاده گردید. یک Unit آنزیم در واقع مقدار آنزیمی است که باعث آزاد شدن یک میکرومول قند احیا کننده در یک دقیقه می شود. این نمودار با استفاده از مقدار جذب غلظت های مختلف زایلوز در طول موج ۵۴۰ نانومتر با کمک نرم افزار Excell رسم شد.



شکل ۳-۱۵: منحنی استاندارد زایلوز

۳-۱۰- تعیین دمای بهینه

تغییر دما موجب آزاد شدن انرژی جنبشی آنزیم‌ها می‌شود. بنابراین هر آنزیمی در محدوده‌ی خاصی از دما حداکثر فعالیت خود را نشان می‌دهد. بیشتر آنزیم‌ها در دماهای پایین و نزدیک به صفر کمترین فعالیت را از خود نشان می‌دهند و عموماً با افزایش دما نرخ واکنش آنزیمی افزوده می‌گردد. بیشتر شدن فعالیت آنزیم‌ها از حد معینی نیز سبب دناتوراسیون ساختمان آنزیم‌ها می‌شود. بنابراین فعالیت آنزیم در دماهای $^{\circ}\text{C } 4-16-22-28-37-40-42-45-50-55$ آنزیم مورد بررسی قرارگرفت و دمای $^{\circ}\text{C } 42$ به عنوان دمای بهینه تعیین گشت. (شکل ۳-۱۶)

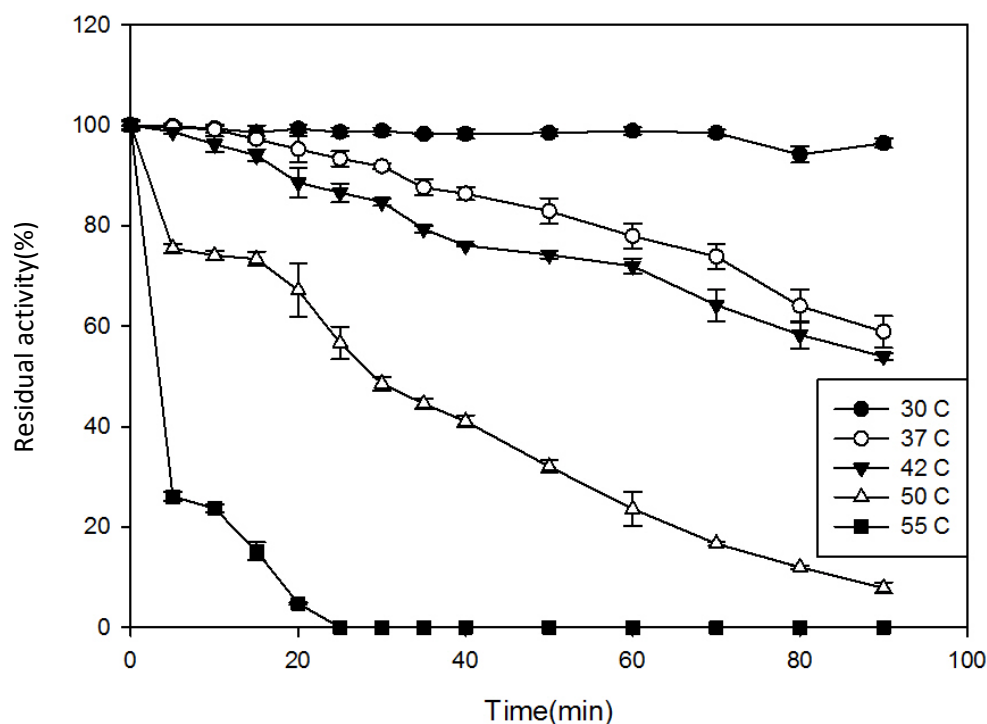


شکل ۳-۱۶: اثر دما بر روی فعالیت آنزیم

۳-۱۱- پایداری حرارتی آنزیم خالص در دماهای مختلف در زمان‌های ۵ تا ۹۰ دقیقه

اکثر آنزیم‌ها در دماهای بالا، ساختمان سه بعدی پروتئینی خود را از دست می‌دهند زیرا به علت افزایش انرژی پتانسیل شیمیایی و در نتیجه ایجاد بی‌نظمی در سیستم، بعضی از پیوندهای ضعیف که مشخص کننده‌ی ساختار سوم پروتئین هستند سست شده و شکسته می‌شوند و این مسئله منجر به تجزیه‌ی حرارتی پروتئین و غیرفعال شدن کاتالیتیکی آنزیم می‌گردد. پایداری دمایی آنزیم

در دماهای مختلف و در زمان‌های ۵-۱۰-۱۵-۲۰-۲۵-۳۰-۳۵-۴۰-۵۰-۶۰-۷۰-۸۰-۹۰ دقیقه بررسی شد. (شکل ۳-۱۷)



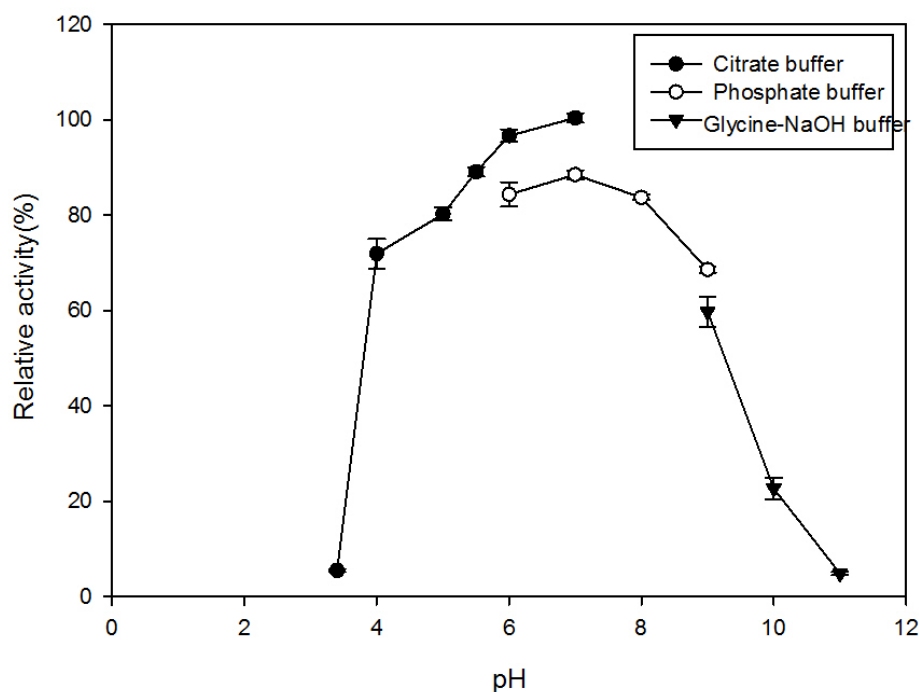
شکل ۳-۱۷: بررسی پایداری حرارتی آنزیم در مدت زمان ۹۰ دقیقه و در دماهای ۳۰-۳۷-۴۲-۵۰-۵۵-۶۰ درجه‌ی سانتی گراد

۳-۱۲- تعیین pH بهینه برای حداکثر فعالیت آنزیم خالص

هر گونه تغییرات pH سبب تغییر فعالیت آنزیمی می‌گردد که این امر از چند طریق موثر است:

الف : pH های خیلی اسیدی و یا خیلی قلیایی سبب غیر فعال شدن مولکول پروتئینی آنزیم و نیز دگرگونی پیوند آپوآنزیم می‌گردد. **ب:** تغییرات pH در اغلب موارد بر میزان یونیزه شدن سوبسترا موثر است. **ج :** تغییرات pH بر روی درجه یونیزاسیون اسیدهای آمینه که در تشکیل جایگاه فعال آنزیم به کار رفته‌اند موثر می‌باشد و بدین ترتیب است که بر میل ترکیبی آنزیم و سوبسترا اثر می‌گذارد. در این راستا فعالیت آنزیم در pH های ۳ تا ۱۱ سنجیده‌شد و بهترین فعالیت آنزیمی در pH ۷ به دست آمد ولی در pH های بالاتر و پایین‌تر از آن نیز فعالیت آنزیم تا حدودی حفظ می‌شود. با

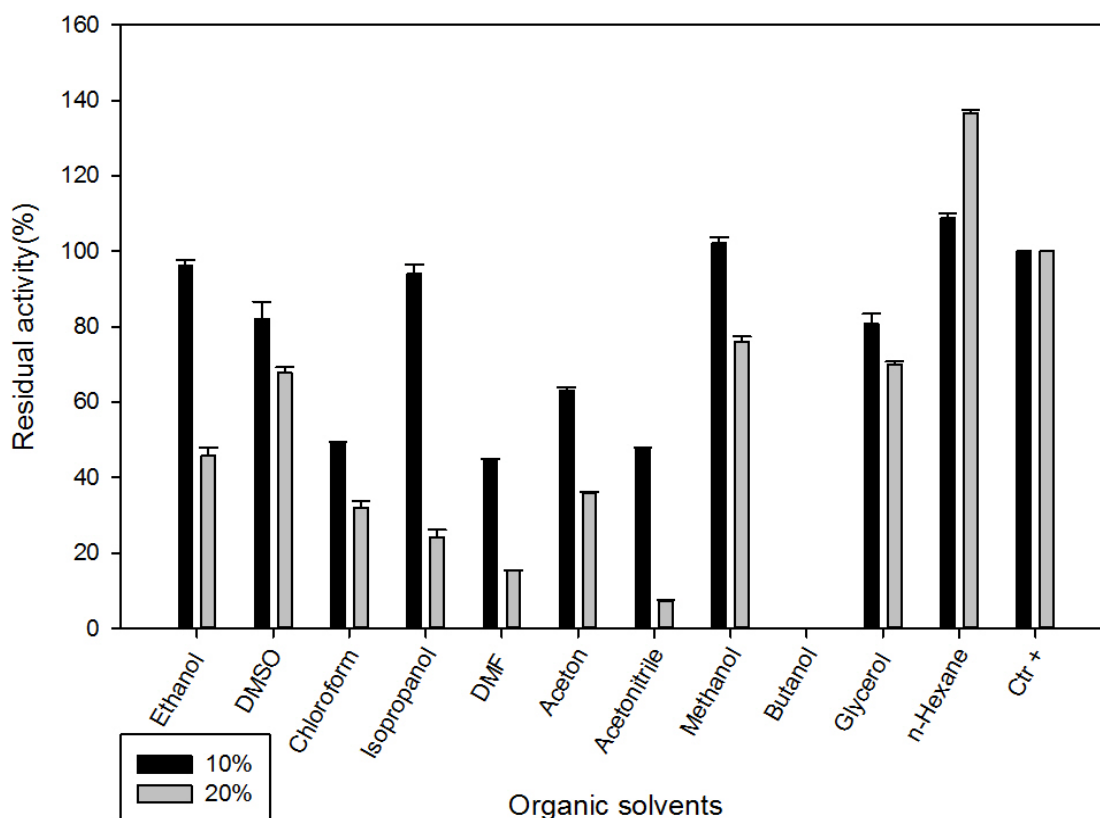
توجه به اینکه pH مطلوب برای فعالیت آنزیم ۷ است می توان نتیجه گرفت تمایل به محیط خنثی دارد. (شکل ۳-۱۸)



شکل ۳-۱۸: بررسی اثر pH روی فعالیت آنزیم در سه بافر سیترات فسفات pH ۳ تا pH ۷ - بافر فسفات pH ۶ تا pH ۹ و بافر Glycin- NaOH برای pH ۹ تا pH ۱۰

۳-۱۴- تاثیر یونها بر فعالیت آنزیم

از عوامل اصلی تأثیرگذار بر فعالیت آنزیم‌ها، کوفاکتورها هستند که به صورت طبیعی در ساختمان آنزیم و یا در محیط وجود دارند که می‌توانند اثر فعال‌کننده و یا بازدارنده را بر روی فعالیت آنزیم داشته باشند. بنابراین با بررسی تأثیر یون‌های فلزی می‌توان دریافت که آنزیم در حضور این مواد در صنعت چقدر از فعالیت خود را می‌تواند حفظ نماید. به همین منظور سنجش فعالیت آنزیم بعد از گرماگذاری آنزیم با یون‌های فلزی با غلظت ۱۰ و ۵ میلی‌مولار انجام شد و مشاهده گردید آنزیم در حضور Na ، Co و NH_4 افزایش فعالیت از خود نشان می‌دهد. سایر یونها اثر محسوسی بر فعالیت آنزیم نداشتند. (شکل ۳-۱۹)

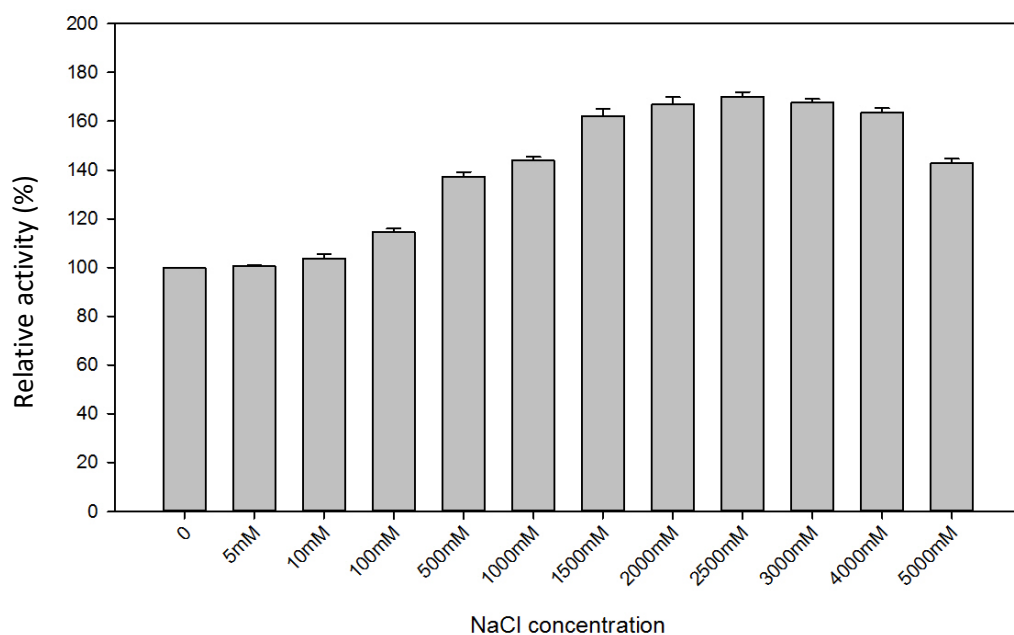


شکل ۳-۲۱: بررسی اثر ترکیبات آلی بر فعالیت آنزیم در دو غلظت متفاوت

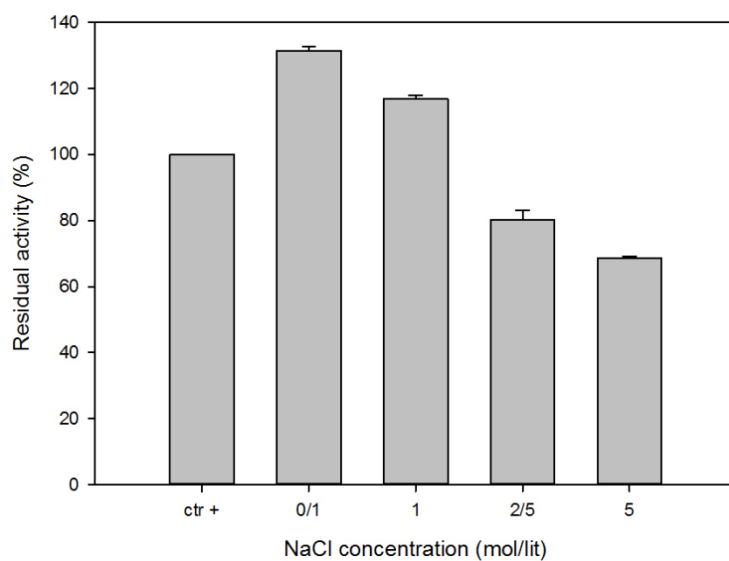
۳-۱۶- بررسی فعالیت و پایداری آنزیم در غلظت‌های مختلف نمک خوراکی (سدیم کلراید)

توانایی رشد میکروارگانیسم‌ها در غلظت‌های مختلف نمک سدیم کلراید متفاوت است. میکروارگانیسم‌هایی که بهینه رشد آنها در محیط فاقد نمک یا غلظت‌های پایین‌تر از نمک دریا باشد ولی تراکم‌های نسبتاً بالای نمک را نیز تحمل می‌کنند، تحمل‌کننده‌ی نمک نامیده می‌شوند. در این تحقیق، به واکنش آنزیم خالص غلظت‌های ۵ میلی‌مولار تا ۵ مولار نمک $NaCl$ اضافه شد. آنزیم قادر به تحمل نمک تا غلظت ۵ مولار بود و در غلظت ۲,۵ مولار نمک سدیم کلرید دارای افزایش فعالیت معناداری نسبت به نمونه‌ی کنترل مثبت و نمونه‌های دیگر با غلظت‌های متفاوت نمک است.

(شکل ۳-۲۲ و شکل ۳-۲۳)



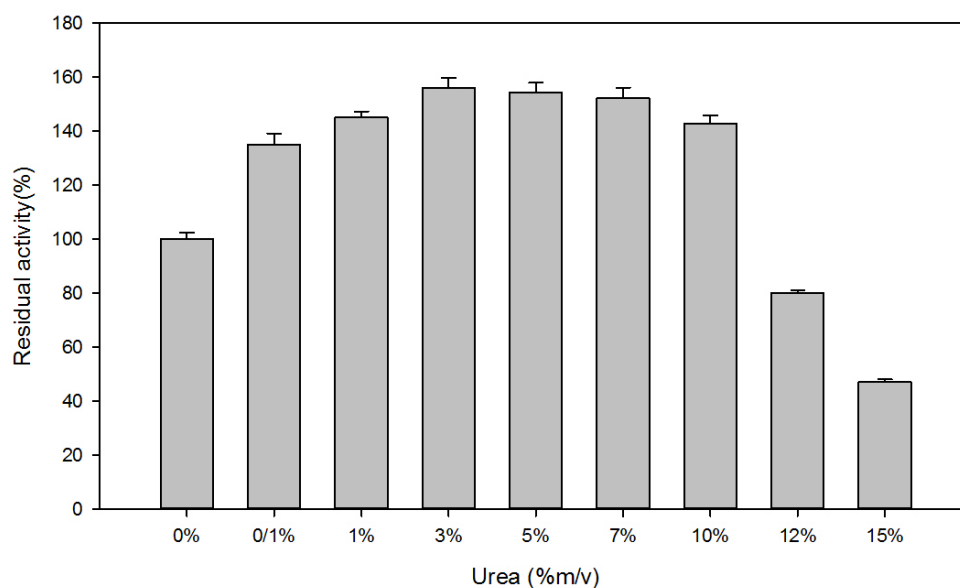
شکل ۳-۲۲: بررسی فعالیت آنزیم در حضور نمک خوراکی



شکل ۳-۲۳: بررسی پایداری آنزیم در حضور نمک خوراکی (تست پایداری بعد از ۲۴ ساعت مجاورت آنزیم

و نمک در دمای اتاق)

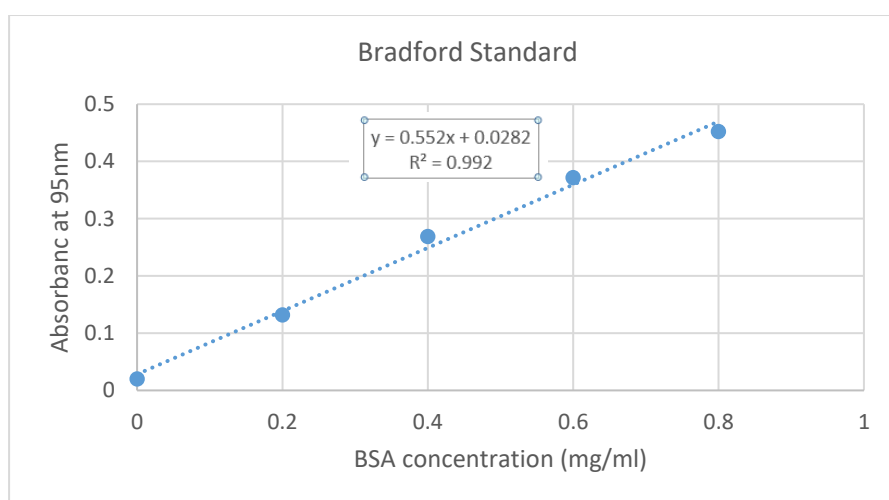
۱۷-۳- فعالیت آنزیم در حضور ماده‌ی دناتوره‌کننده‌ی آور



شکل ۳-۲۴: بررسی فعالیت آنزیم در حضور آور

۱۸-۳- رسم منحنی استاندارد غلظت پروتئین

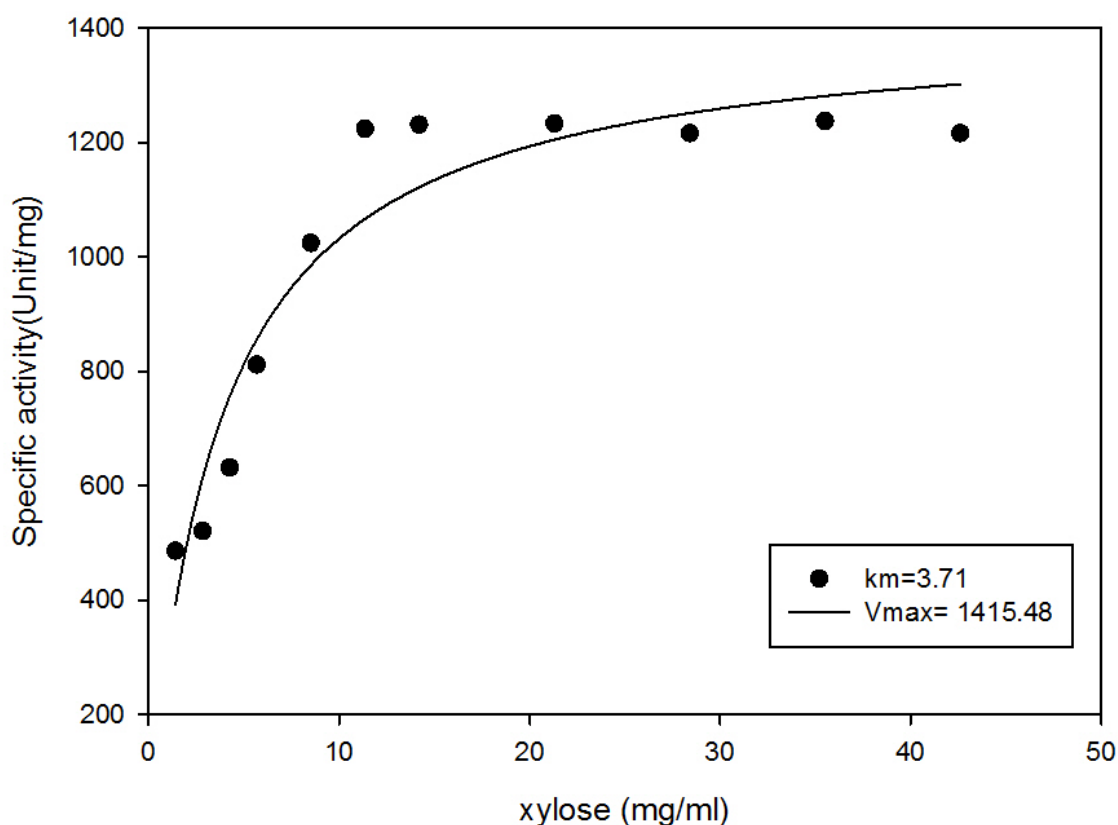
برای سنجش غلظت آنزیم از روش برادفورد استفاده شد. منحنی استاندارد غلظت پروتئین با استفاده از نرم‌افزار Excell رسم و معادله خط محاسبه گردید. با جای‌گذاری ODهای مربوط به نمونه‌های پروتئینی به جای y غلظت پروتئین‌ها محاسبه شد. (شکل ۳-۲۵)



شکل ۳-۲۵: منحنی استاندارد غلظت پروتئین به روش برادفورد و با استفاده از Bovine serum albumin

۳-۱۹- محاسبه‌ی ویژگی‌های کینتیکی آنزیم زمانی که از زایلوز به عنوان سوبسترا استفاده می‌شود، کینتیک این آنزیم از معادله‌ی میکائیلیس- منتن پیروی خواهد کرد. (شکل ۲۶-۳) پارامترهای کاتالیکی آنزیم نیز با استفاده از نرم افزار Sigmaplot محاسبه گردید. K_m به عنوان تمایل آنزیم برای سوبسترای خود تعریف می‌شود و هرچه میزان K_m کوچکتر باشد تمایل آنزیم برای سوبسترا بیشتر خواهد بود V_{max} ، زمانی رخ می‌دهد که کلیه جایگاه‌های فعال آنزیم توسط سوبسترا اشغال شده باشد و مولکول‌های سوبسترا به فراورده تبدیل شده و آنزیم آزاد می‌شود تا مولکول دیگری از سوبسترا بلافاصله به آن متصل شود. ثابت کاتالیتیک یا عدد نوسازی سبب محدودیت واکنش آنزیمی در جهت تولید محصول میگردد و با K_{cat} نمایش داده می‌شود. در واقع ثابت کاتالیتیک وابسته به مجموع ثابت مراحل است که سرعت واکنش را محدود می‌کنند. ثابت کاتالیتیک فعالیت مولی آنزیم را نشان می‌دهد و واحد آن معکوس زمان می‌باشد. این فعالیت، معادل تعداد مولکول‌های سوبسترای است که توسط یک مولکول آنزیم در زمان اشباع بودن آن از سوبسترا در واحد زمان به محصول تبدیل می‌گردد.

ثابت ویژگی یا همان نسبت k_{cat}/K_m ثابت سرعت درجه‌ی دوم با واحد $(M^{-1}s^{-1})$ است و از آن به عنوان معیاری برای قدرت کاتالیتیک محسوب می‌شود و با استفاده از آن می‌توان تمایل آنزیم به سوبستراهای مختلف را مقایسه نمود. (جدول ۳-۱ و جدول ۳-۲)



شکل ۳-۲۶: منحنی میکاییلیس متون آنزیم زایلاناز

جدول ۳-۱: بررسی ویژگیهای کینتیکی آنزیم

نوع سوبسترا	$V_{max}(\text{unit/mg})$	$K_m(\text{mg/ml})$	$K_{cat}(s^{-1})$	$K_{cat}/K_m(\text{mg}^{-1}s^{-1})$
<i>Oat spelt xylan</i>	۱۴۱۵,۴۸	۳,۷۱	۱۲۷۵۲,۰۷	۳۴۳۷,۲۱

۳-۲۰ بررسی فعالیت ویژه و عدد نوسازی آنزیم بر روی سوبستراهای سخت

جدول ۳-۲: بررسی فعالیت ویژه آنزیم بر روی سوبستراهای سخت

سوبسترا	نوع پیوند	فعالیت ویژه (unit/mg)
سبوس برنج	$\beta - (1 \rightarrow 4)$	۴۱,۶۱
کاه جو	$\beta - (1 \rightarrow 4)$	-
سبوس گندم	$\beta - (1 \rightarrow 4)$	۱۰۸,۲۵۸۱
کربوکسی متیل سلولز		-

فصل چهارم

بحث و نتیجه گیری

در دنیای امروز دفع ضایعات منجر به مشکلات عدیده‌ی زیست‌محیطی می‌شود، درحالی‌که از آنها می‌توان به‌منظور تهیه انرژی، غذا و سایر مواد مفید استفاده نمود. آنزیم‌ها می‌توانند با عملی کردن فرآیندهای مختلف در این امر مهم بسیار حائز اهمیت باشند. نکته قابل توجه در این میان، تولید آنزیم‌ها با هزینه‌های معقول می‌باشد. به طور کلی منابع استحصال آنزیم‌ها شامل گیاهان، قارچ‌ها، جانوران و میکروارگانیسم‌ها می‌باشند. تا دهه ۶۰ میلادی، حدود ۷۰ درصد از آنزیم‌ها از بافت‌های گیاهی و جانوری استحصال می‌شد، درحالی‌که پس از بیست سال این وضعیت به نفع منابع میکروبی تغییر نمود، در حال حاضر آنزیم‌های میکروبی ۹۰ درصد از کل بازار تجارت آنزیم‌ها را به خود اختصاص داده است. دلیل آن این است که میکروارگانیسم‌ها دارای سیستم‌های سلولی کارآمدی برای تولید آنزیم می‌باشند. میکروب‌ها ز نظر متابولیکی پیچیده بوده و بطور کامل تطابق‌پذیر می‌باشند. همچنین تکثیر آنها آسان و احتیاجات غذایی آنها ساده است، این مشخصه‌ها منجر به آن شد که تولید آنزیم‌های میکروبی قابل اعتماد، ساده و ارزان باشند. با توجه به اینکه یکی از دلایل گران قیمت بودن آنزیم‌ها، انحصاری بودن تولید آنها توسط برخی از کشورها و هزینه‌های مربوط به واردات آنها می‌باشد، تولید آنزیم مورد نیاز با هزینه مناسب و با استفاده از منابع در دسترس و ارزان می‌تواند گامی به‌سوی کاهش واردات باشد و منجر به بازده مناسب و سودمندی در صنایع مختلف گردد. بنابراین با وجود در دسترس بودن آنزیم‌های تجاری، مطالعات مختلف به منظور معرفی منابع جدید با ویژگی‌های خاص همچنان ادامه دارد. در این راستا اخیراً تحقیق و جستجوی متاژنومیکس برای یافتن آنزیم‌های جدید و مورد کاربرد در بیوتکنولوژی مورد توجه محققین قرار گرفته است. در این تحقیق از شکمبه شتر به عنوان منبع آنزیمی بهره گرفته شده است دلیل این امر آن است که شتر توانایی هضم علوفه‌جات و گیاهان خشک و نمکی را دارا بوده و در هضم ترکیبات لیگنوسلولزی نسبت به گاو و گوسفند به دلیل تکامل سیستم گوارش و همچنین تفاوت ساختار شکمبه با شکمبه سایر نشخوارکنندگان موفق‌تر عمل می‌کند. از دیگر برتری‌های شتر می‌توان به تحمل شرایط کم آبی و نمکی اشاره کرد. زیلائنازهایی که امروزه به صورت تجاری موجود می‌باشند عموماً از منابع قارچی همچون تریکودرما استخراج می‌شوند. از دلایل این استفاده می‌توان به فعالیت بالای این آنزیم‌ها و نیز تولید بالای آنزیم‌ها در قارچ‌ها اشاره کرد، هر چند جستجو برای یافتن زیلائنازهایی با منشأ باکتریایی

با فعالیت و ویژگی های منحصر به فرد همچنان ادامه دارد زیرا بیان و دستکاری آنزیم های باکتریایی راحت تر از همتایان یوکاریوتی آنها می باشد.

زایلانازهای شناخته شده از خانواده ۱۱ گلیکوزید هیدرولازها از منابع قارچی و باکتریایی استخراج شده اند. آنزیم های متعلق به این خانواده دارای ساختار β -jelly-roll بوده و چندین رشته ی بتا ناموازی تقریباً به اندازه ی ۹۰ درجه خم شده اند و جایگاه اتصال به سوبسترا را در جایگاه فعال آنزیم ایجاد نموده اند دو گلوتامیک اسید کاتالیزی در مقابل هم قرار دارند و فرایند هیدرولیزی با جابه جایی دوگانه انجام می دهند یک گلوتامیک اسید به عنوان کاتالیزور اسید بازی و دیگری به عنوان هسته دوست (نوکلئوفیل) عمل می کند

تا به امروز آنزیم هایی که متعلق به این خانواده بوده اند در Protein Data Bank موجود بوده و ممکن است تفاوت قابل ملاحظه در لوپ های سطحی عامل تمایز در اختصاصیت به سوبستراهای مختلف در بین آنها باشد آن ها عبارتند از :

- *Aspergillus awamori* xylanase C (xynC).
- *Bacillus circulans, pumilus, stearothermophilus and subtilis* xylanase (xynA).
- *Clostridium acetobutylicum* xylanase (xynB).
- *Clostridium stercorarium* xylanase A (xynA).
- *Fibrobacter succinogenes* xylanase C (xynC) which consist of two catalytic domains that both belong to family 10.
- *Neocallimastix patriciarum* xylanase A (xynA).
- *Ruminococcus flavefaciens* bifunctional xylanase XYL A (xynA).

این پروتئین شامل سه دومین است:

- دومین کاتالیتیکی زایلاناز در پایانه ی N متعلق به خانواده ی ۱۱ گلیکوزیل هیدرولاز

- در دومین مرکزی ترکیب کوتاه تکراری گلوتامین، آسپارژین و یک تریپتوفان

- دومین کاتالیتیکی زایلاناز در پایانه ی C متعلق به خانواده ی ۱۰ گلیکوزیل هیدرولاز

- *Schizophyllum commune* xylanase A.
- *Streptomyces lividans* xylanases B (xlnB) and C (xlnC).
- *Trichoderma reesei* xylanases I and II.

خانواده ۱۱ شامل آنزیم های زایلاناز می باشد BLAST توالی پروتئین مورد نظر در این پژوهش نیز بیشتر از ۶۲ درصد تشابه را با آنزیم های دیگر از خود نشان نداد . با توجه به چنین شباهت کمی، نیاز به انجام مطالعات ساختاری دقیق تر برای مطالعات بعدی روی آنزیم ضروری به نظر می رسد. در

مطالعه‌ی انجام شده آنزیم اندوزایلاناز استخراج شده بر روی ضایعات کشاورزی و *oat spelt xylan* در مقایسه با سایر اندوزایلانازها مورد تحقیق قرار گرفته‌ی باکتریایی و قارچی همچون اندوزایلاناز قارچی جدا شده از *Trichoderma harzianum* توسط Tan et al (1985) و یا اندوزایلاناز جدا شده از *Sorangium cellulosum So9733-1* توسط Wang et al. (2012) قابلیت تخریب بیشتری از خود بر روی *oat spelt xylan* نشان داد. همچنین آنزیم مورد مطالعه بر روی سبوس برنج و گندم نیز اثر داده شد و بر روی کاه جو اثر قابل ملاحظه‌ی هیدرولیز رویت نشد که می‌توان در توجیه آن به وجود مقادیر بیشتر همی سلولز و لیگنین در ساختار سبوس برنج و گندم در مقایسه با کاه جو اشاره کرد که دارای ساختار نسبتاً ساده بوده و تجزیه‌ی آن بدون نیاز به همکاری چند آنزیم امکان پذیر است. آنزیم اندوزایلاناز تخلیص شده طبق پیش‌بینی‌ها قادر به تجزیه‌ی کربوکسی متیل سلولوز که سوبسترای تخصصی اندوگلوکانازها می‌باشد نبود.

عموم آنزیم‌ها در شرایط شدید اسموتیک و حضور نمک فعالیت خود را از دست می‌دهند در نتیجه آنزیم‌هایی که بتوانند مواد شیمیایی و شرایط سخت نمکی را تحمل کنند بیشتر مورد توجه محققین قرار گرفته است (xin et al., 2012).

از بین منابع مختلف تولید کننده‌ی زایلاناز متائزوم شکمبه شتر یکی از بهترین نامزدها برای استخراج چنین آنزیم‌هایی می‌باشد زیرا شتر عموماً از مواد غذایی سخت‌تر و درختچه‌های شور در مقایسه با دیگر نشخوارکنندگان بهره می‌جوید. آنزیم اندوزایلاناز استخراج شده توانست در حضور مقادیر بالای نمک تا حدود ۲/۵ مولار تا ۱۶۰٪ افزایش فعالیت داشته و توانسته ظرف ۲۴ ساعت در حضور نمک یک مولار نه تنها فعالیت خود را حفظ کند بلکه افزایش فعالیت نیز داشته است. آنزیم در حضور ۵ مولار نمک توانست ۱۲۰ درصد فعالیت داشته باشد که این تحمل و میزان فعالیت را می‌توان با نوع تغذیه شتر مرتبط دانست که عمدتاً توانایی زیست در شرایط کم آبی و نمکی را دارا می‌باشد و همچنین پایداری آنزیم در نمک نیز در مدت ۲۴ ساعت و در دمای اتاق در مقایسه با حالت معمولی تغییر چندانی نشان نداد که حاکی از پایداری بالای نمکی آنزیم دارد. تحمل نمک توسط آنزیم مورد تحقیق در این مطالعه از مقدار تحمل نمک توسط آنزیم اندوزایلاناز استخراج شده از *bacillus cellulosilyticus* که نوعی هالوفیل است و توسط Jiam wu et al.,

(2016) تعیین ویژگی شد و حدود دو برابر می‌باشد. آنزیم اندوزایلاناز استخراج شده در حضور مقادیر بالای حلال‌های آلی با $\text{Log Pow} > 0.89$ همچون ان هگزان- متانول- اتانول فعالیت خود را حفظ و در مواردی همچون ان-هگزان حتی افزایش ۲۰ درصدی نیز از خود نشان داد. آنزیم در حضور بوتانول- کلروفرم از خود کاهش فعالیت نشان داد که حاکی از تمایل آنزیم به حلال‌های غیرقطبی و هیدروفوب می‌باشد. در واقع ممکن است این حلال‌ها با اسید آمینه‌های هیدروفوب سطح آنزیم وارد واکنش شده و مانع از پوشانده شدن جایگاه فعال آنزیم و کمک به باز بودن ساختار آنزیم می‌کنند (Xin Li, 2013). از مزیت- های دیگر آنزیمی با چنین ویژگی هایی می‌توان به کاهش آلودگی میکروبی در واکنش‌های شیمیایی استفاده از مواد لیگنوسلولوزی اشاره کرد که عموماً برای کاهش آلودگی میکروبی از بعضی حلال‌های آلی استفاده می‌شود.

آنزیم مورد تحقیق در این پژوهش در مقایسه با اندوزایلاناز استخراج شده از قابلیت تحمل بالاتر در برابر غلظت ۲۰ درصد دترجنت های مختلف همچون *Tritonx100* یا *Tween 20* و *Tween 80* را از خود نشان داد. آنزیم‌هایی با قابلیت تحمل دترجنت‌ها را می‌توان در صنایع کاغذ سازی استفاده کرد که مواد اولیه این صنایع حاوی این نوع مواد می‌باشند. آنزیم اندوزایلاناز استخراج شده در حضور یون‌های فلزی همچون روی- پتاسیم- منیزیم- آهن تغییر چندان زیادی از خود نشان نداد ولی توسط یون‌های آمونیوم، کبالت و سدیم افزایش درصد از خود نشان داد که می‌توان دلیل آن را در پایدار کردن ساختار سوم پروتئین به خاطر تغییر پیوندهای الکترواستاتیک آنزیم در حضور این یون‌ها دانست. همچنین فعالیت آنزیم در حضور *EDTA* بسیار کاهش پیدا کرد که می‌توان گفت این آنزیم به نوعی یک متالوآنزیم است. آنزیم استخراج شده توانست در حضور مقادیر مختلف اوره تا ۷٪ افزایش فعالیت ۵۰ درصدی از خود نشان دهد که دلیل آن را می‌توان به حضور اوره در شکمبه شتر مرتبط دانست. اوره یک کائوتروپ قدرتمند بوده و موجب از بین رفتن پیوندهای هیدروژنی و پیوند دوقطبی-دوقطبی و در نهایت موجب دناتوراسیون پروتئین‌ها می‌گردد.

آنزیم توانست در حضور دی تیوتریتول از خود افزایش فعالیت نشان داد که دلیل آن را می‌توان با جلوگیری از تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی در نواحی غیر منظم پروتئین مربوط دانست چنین وضعیتی شبیه به اندوزایلانازهای مشاهده شده نیست.

از بین دترجنت‌های یونی و غیر یونی فقط SDS توانست فعالیت آنزیم را به طور کامل مهار نماید. دلیل مهار آنزیم توسط SDS را می‌توان تخریب تمام پیوندهای غیر کوالان بین زیرواحدهای سازنده-ی پروتئین دانست. مقادی بالای دترجنت‌های غیر یونی اثر چندانی بر فعالیت آنزیم نداشتند. همچنین آنزیم در حضور ۵ میلی مولار PMSF از خود کاهش فعالیت نشان نداد که با توجه به اثر PMSF بر روی زیرواحد سرین می‌توان گفت سرین نقش قابل توجهی در جایگاه کاتالیتیک آنزیم ندارد.

دمای بهینه ی فعالیت آنزیم ۴۲ درجه سانتی‌گراد تشخیص داده شد و آنزیم در این دما تا بیش از ۳ ساعت نیز پایداری خود را حفظ می‌کند و آنزیم اندوزایلاناز در دمای اتاق نیز تا بیش از ۲ روز نیز کاهش فعالیت را از خود نشان نداد. pH و دمای بهینه‌ی آنزیم نزدیک به pH و دمای نرمال در شکمبه شتر تشخیص داده شد

پژوهش انجام شده اهمیت شناخت منابع متاژنومی را برای کشف آنزیم‌های جدید و دارای قدرت تحمل شرایط سخت را نشان می‌دهد. از طرفی با توجه به آلودگی بالای سوخت‌های زیستی و تجدیدنپذیر بودن آنها امروزه تمایل برای تولید سوخت‌های زیستی پاک و تمام نشدنی همچون اتانول زیستی و بوتانول زیستی از ترکیبات همی سلولزی بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌است. آنزیم اندوزایلانازی استخراج شده با اثر بر روی ترکیبات سخت سلولزی همچون کاه و سبوس در همکاری با سایر آنزیم‌های تجزیه‌کننده ترکیبات سلولیتیک همچون سلولاز و بتاگلوکزیداز می‌تواند گزینه‌ی مناسبی برای تولید سوخت‌های زیستی از ضایعات لیگنوسلولزی باشد.

پیشنهادهات

- انجام مطالعات بیوانفورماتیکی در جهت انجام تکنیک‌هایی همچون Site direct mutagenesis در جهت دست یابی به آنزیمی با ویژگی‌های دمایی و pH بهتر
- بررسی عملکرد آنزیم در همکاری با آنزیم‌های تجزیه‌کننده سلولوز در جهت هضم ترکیبات لیگنوسلولزی
- همسانه‌سازی ژن زایلاناز استخراج شده به همراه سایر ژن‌های دخیل در تجزیه‌ی زایلان در جهت تولید الکل از ضایعات کشاورزی
- انجام تکنیک CD بر روی آنزیم در جهت شناسایی ساختار دوم
- انجام تکنیک‌های فلورسنت در جهت رصد تغییرات ساختمانی آنزیم هنگام همراهی با مواد فعال کننده‌ی آن همچون نمک، اوره و دی‌تیوترایتول
- تثبیت آنزیم روی سطوحی همچون سیلیکا برای بهبود پایداری حرارتی آنزیم.

منابع

مجد، الف. و م.ع. شریعت زاده، ۱۳۸۱. زیست شناسی سلولی و مولکولی (جلد اول و دوم). چاپ سیزدهم. انتشارات آییژ، تهران. محمدی، رضا. ۱۳۸۱. اصول بیوشیمی لنینجر. کاکس، م.، نلسون، د. جلد اول. انتشارات آییژ، تهران

قرچایی، جواد. ۱۳۹۳، "آنالیز متازنومیکس میکروب های شکمبه شتر". پایان نامه ی دکترای تخصصی ژنتیک مولکولی، پژوهشکده ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

Amon, T., Amon, B., Kryvoruchko, V., Machmüller, A., Hopfner-Sixt, K., Bodiroza, V., ... & Zollitsch, W. (2007). Methane production through anaerobic digestion of various energy crops grown in sustainable crop rotations. *Bioresource Technology*, 98(17), 3204-3212

Bajpai, P. (2014). *Xylanolytic Enzymes*, Elsevier Science.

Bayer, E. A., et al. (1994). "The cellulosome — A treasure-trove for biotechnology." *Trends in Biotechnology* 12(9): 379-386.

Beg, Q., et al. (2001). "Microbial xylanases and their industrial applications: a review." *Applied Microbiology and Biotechnology* 56(3): 326-338.

Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology advances*, 18(5), 355-383.

Campbell, C. J., & Laherrère, J. H. (1998). The end of cheap oil. *Scientific American*, 278(3), 60-5.

Cellulase: Types and Action, Mechanism, and Uses. Nova Science Publishers, 2011.

Chakdar, H., et al. (2016). "Bacterial xylanases: biology to biotechnology." *3 Biotech* 6(2): 150.

Coughlan, M. P., & Hazlewood, G. P. (1993). beta-1, 4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 17(3), 259-289

Coutinho, P. M. (1999). The modular structure of cellulases and other carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. *Genetics, biochemistry and ecology of cellulose degradation*, 15-23.

Fernandez-Lafuente, R. (2009). Stabilization of multimeric enzymes: strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme and microbial technology*, 45(6), 405-418.

Gharechahi, J., Zahiri, H. S., Noghabi, K. A., & Salekdeh, G. H. (2015). In-depth diversity analysis of the bacterial community resident in the camel rumen. *Systematic and applied microbiology*, 38(1), 67-76.

Higuchi, T. (Ed.). (2012). *Biosynthesis and biodegradation of wood components*. Elsevier.

Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S., & Tiffany, D. (2006). Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30), 11206-11210.

Jørgensen, H., Kristensen, J. B., & Felby, C. (2007). Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1(2), 119-134.

Lehninger, A. L. (1982). *Principles of Biochemistry*, p 127.

Levin, D. B., et al. (2007). "Potential for hydrogen and methane production from biomass residues in Canada." *Bioresource Technology* 98(3): 654-660.

Li, X. H., Yang, H. J., Roy, B., Wang, D., Yue, W. F., Jiang, L. J., ... & Miao, Y. G. (2009). The most stirring technology in future: Cellulase enzyme and biomass utilization. *African Journal of Biotechnology*, 8(11).

Lin, L.-L. and J. A. Thomson (1991). An analysis of the extracellular xylanases and cellulases of *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c *FEMS Microbiology Letters* 84(2): 197-203.

Mosier, N., et al. (2005). "Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass." *Bioresource Technology* 96(6): 673-686.

Novagen.pET system manual, 11th edition, 2005

Orpin, C. G. and K. N. Joblin (1997). The rumen anaerobic fungi. *The Rumen Microbial Ecosystem*. P. N. Hobson and C. S. Stewart. Dordrecht, Springer Netherlands: 140-195.

Socol, C. R., de Souza Vandenberghe, L. P., Medeiros, A. B. P., Karp, S. G., Buckeridge, M., Ramos, L. P., ... & Torres, F. A. G. (2010). Bioethanol from

lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. *Bioresource technology*, 101(13), 4820-4825.

Sun, J., et al. (2016). Characterization of a Salt-Tolerant and Cold-Adapted Xylanase from *Bacillus cellulosilyticus*.

Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, 83(1), 1-11.

Sunna, A. and G. Antranikian (1997). "Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria." *Critical Reviews in Biotechnology* 17(1): 39-67.

Shleser, R. (1994). Ethanol Production in Hawaii: Processes, Feedstocks, and Current Economic Feasibility of Fuel Grade Ethanol Production in Hawaii: Final Report. Hawaii State Department of Business, Economic Development & Tourism, Energy Division.

Tan, L. U. L., et al. (1985). "Purification and characterization of two d-xylanases from *Trichoderma harzianum*." *Enzyme and Microbial Technology* 7(9): 425-430.

Twomey, L. N., et al. (2003) "The effects of increasing levels of soluble non-starch polysaccharides and inclusion of feed enzymes in dog diets on faecal quality and digestibility." *Animal Feed Science and Technology* 108(1): 71-82.

von Engelhardt, W., Dycker, C., & Lechner-Doll, M. (2007). Absorption of short-chain fatty acids, sodium and water from the forestomach of camels. *Journal of Comparative Physiology B*, 177(6), 631-640.

Wang, M., et al. (2012). "Biocatalyst development by directed evolution." *Bioresource Technology* 115: 117-125.

Xing, M.-N., et al. (2012). "Application of metagenomic techniques in mining enzymes from microbial communities for biofuel synthesis." *Biotechnology Advances* 30(4): 920-929.

Xin, F. and J. He (2013). "Characterization of a thermostable xylanase from a newly isolated *Kluyvera* species and its application for biobutanol production." *Bioresource Technology* 135: 309-315.

پیوست ها

۱- تجهیزات آزمایشگاهی مورد استفاده

جدول ۱: تجهیزات آزمایشگاهی مورد استفاده

نام دستگاه	شرکت سازنده	نام دستگاه	شرکت سازنده
هیتر استیرر	Bibby	ترازو	Allied
اتوکلاو	Iran Tolid	ترازوی حساس	Mettler
pH متر	Cenco	سانتریفیوژ معمولی	Pars Asma Co
میکروپیوژ یخچال دار	Beckman	سانتریفیوژ یخچال دار	Eppendorf
بن ماری	پارس آزما	میکرو سانتریفیوژ	Hettich
ور تکس	Heidolph	بن ماری چیلر دار	Pars Asma Co
میکرو اسپین	Kiagene	آون	Thelco
سمپلر	Eppendorf	فریزر (۷۰- درجه)	Jahl
انکوباتور	Herause	فریزر (۲۰- درجه)	Pars
شیکر انکوباتور	Certoma	تانک الکتروفورز افقی	Biorad
اسپکتروفوتومتر	Biorad	هودهای بیولوژی مولکولی	ژال
PCR دستگاه	TECHNE	الکتروفورز	BIO-RAD

۲- مواد مورد استفاده

کلیه ی آنزیم های مورد استفاده، نشانگر اندازه DNA، نشانگر پروتئینی، IPTG از شرکت Fermentas خریداری شدند. کیت های استخراج پلازمید PCR Purification برای خالص سازی محصولات از شرکت Geneall خریداری گردید. آنتی بیوتیک کانامایسین، آگارز-oat spelt xylan از شرکت سیگما (Steinheim, USA) خریداری شد. آکریل آمید، بیس آکریل آمید، APS و TEMED و آگار از شرکت Merk (Darmstadt, Germany) تهیه شد.

۳- محلول‌ها و ترکیبات مورد نیاز در تهیه‌ی سلول‌های مستعد

جدول ۲: محلول‌ها و ترکیبات مورد نیاز در تهیه‌ی سلول‌های مستعد

استریل CaCl_2	۱۰۰ میلی مولار
استریل MgCl_2	۵۰ میلی مولار
گلیسرول ۱۵ درصد	

۴- محلول غلیظ آنتی بیوتیک کانامایسین

جهت تهیه محلول غلیظ این آنتی بیوتیک مقدار ۰/۵ گرم پودر کانامایسین در ۱۰ میلی لیتر آب تزریقی حل شده و محلول ۵۰ میکروگرم در یک میکرولیتر از آن تهیه و در فریزر نگهداری شد. سپس به میزان ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر به محیط های کشت باکتری اضافه گردید.

۵- محلول غلیظ IPTG (۰/۱ میلی مولار)

جهت تهیه محلول غلیظ IPTG مقدار ۱/۲ گرم پودر IPTG با آب تزریقی به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده. فیلتر نموده در 4°C نگهداری شود.

۶- محلول‌های ژل SDS-PAGE

ترکیبات ژل پایین با غلظت ۱۰ درصد به مقدار ۵ میلی لیتر

جدول ۳: ترکیبات ژل پایین SDS-PAGE

H_2O	۱۹۰۰ میکرولیتر
Acrylamide 30%	۱۷۰۰ میکرولیتر
Tris 1.5M pH 8.8	۱۳۰۰ میکرولیتر
Ammonium persulfate 10%	۵۰ میکرولیتر
TEMED	۲ میکرولیتر
SDS 10%	۵۰ میکرولیتر

ترکیب ژل بالا با غلظت ۲ درصد به مقدار ۲ میلی لیتر عبارت است از:

جدول ۴: ترکیبات ژل پائین SDS-PAGE

۱۴۰۰ میکرولیتر	H ₂ O
۳۳۰ میکرولیتر	Acrylamide 30%
۲۵۰ میکرولیتر	Tris 1M pH 6.8
۲۰ میکرولیتر	Ammonium persulfate 10%
۲ میکرولیتر	TEMED
۲ میکرولیتر	SDS 10%

۸- ترکیب بافر

جدول ۵: ترکیب بافر

۱ درصد	SDS
۳ درصد	Tris base
۱۴/۴ درصد	Glycin

۹- ترکیب محلول رنگ بری SDS-PAGE

استیک اسید: متانول: آب مقطر با نسبت ۱۰:۲۰:۷۰

۱۰- ترکیب حلال نمونه (Sample Solvent)

جدول ۶: ترکیب حلال نمونه

۷ میلی لیتر	Tris base 1M pH6.8
۳ میلی لیتر	Glycerol
۶۰۰ میکرولیتر	Mercaptoethanol
۱ گرم	SDS

۱۱- ترکیب بافر فسفات ۰/۲ مولار

برای ساختن بافر با pH مورد نظر، ترکیب x میلی لیتر از A و Y میلی لیتر از B را طبق جدول زیر اضافه کرده و در نهایت حجم را به ۲۰۰ میلی لیتر می‌رسانیم.

جدول ۷: ترکیب بافر فسفات

۰/۲ مولار	(A) محلول NaH_2PO_4
۰/۲ مولار	(B) محلول Na_2HPO_4

جدول ۸: ترکیب بافر

X	Y	pH	X	Y	PH
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

۱۲- ترکیب بافر سیترات- فسفات

برای ساختن بافر با pH مورد نظر، ترکیب x میلی لیتر از A و Y میلی لیتر از B را طبق جدول زیر اضافه کرده و در نهایت حجم را به ۱۰۰ میلی لیتر می‌رسانیم.

جدول ۹: ترکیب بافر

۰/۱ مولار	(A) محلول (اسید سیتریک
۰/۲ مولار	(B) محلول Na_2HPO_4

جدول ۱۰: ترکیب بافر

X	Y	PH	X	Y	pH
44.6	5.4	2.6	25.2	24.8	4.8
42.2	7.8	2.8	24.3	25.7	5.0
39.8	10.2	3.0	23.3	26.7	5.2
37.7	12.3	3.2	22.2	27.8	5.4
35.9	14.1	3.4	21.0	29.0	5.6
33.9	16.1	3.6	19.7	30.3	5.8
32.3	17.7	3.8	17.9	32.1	6.0
30.7	19.3	4.0	16.9	33.1	6.2
29.4	20.6	4.2	15.4	34.6	6.4
27.8	22.2	4.4	13.6	36.4	6.6
26.7	23.3	4.6	9.1	40.9	6.8

۱۳- ترکیبات محیط کشت‌های مختلف

ترکیب محیط کشت LB

جدول ۱۱: ترکیب محیط کشت LB

ترکیب	مقدار مورد نیاز (گرم در لیتر)
NaCl	۱۰
Yeast Extract	۵
Tryptone	۱۰

ترکیب محیط کشت LB آگار

جدول ۱۲: ترکیب محیط کشت LB آگار

ترکیب	مقدار مورد نیاز (گرم در لیتر)
NaCl	۱۰
Yeast Extract	۵
Tryptone	۱۰
Agar-Agar	۱۵

در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند اتوکلاو گردید.

در صورت نیاز به افزودن آنتی بیوتیک، پس از استریل شدن محیط کشت و پائین آمدن دمای آن تا حدود 45°C ، آنتی بیوتیک اضافه و در نهایت محیط کشت در ظروف پتری استریل، در کنار شعله تقسیم شدند.

۱۴- رنگ آمیزی ژل اکریل آمید باکوماسی بلو R-۲۵۰

معمولاً ۵٪ میکروگرم از هر پروتئین در یک باند باکوماسی آبی R-۲۵۰ رنگ می گیرد. رنگ آمیزی و تثبیت ژل همزمان انجام گرفت. این رنگ غیر قطبی است و در محلول متانلی استفاده می شود. ۰/۲۵ گرم کوماسی آبی R-۲۵۰ در ۱۲۵ میلی لیتر متانول حل شده سپس ۲۵ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال و ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. غلظت رنگ در این محلول ۱ درصد (W/V) است. رنگ با کاغذ واتمن صاف شد. پس از تیره شدن محلول رنگ بر، آن را با محلول تازه تعویض و این عمل را چند بار تکرار شد تا زمینه ژل شفاف گردید و باندهای پروتئینی به وضوح دیده شدند. ژل های رنگ شده با کوماسی آبی را در محلول ۷ درصد اسید استیک (در آب مقطر) قرار داده و درب ظرف بسته شد. ژل در این حالت برای مدت های طولانی قابل نگهداری است.

۱۵- طرز تهیه ی محلول کنگورد و رنگ آمیزی : ۰/۱ گرم از کنگورد را در ۱۰۰ سیسی آب مقطر حل کرده و به مدت ۱۵ دقیقه روی نمونه مورد نظر قرار داده تا رنگ پذیری انجام شود و نهایتاً از نمک امولار برای رنگ بری به مدت ۳ دقیقه استفاده میشود.

Abstract

Xylan, composed of repeating glucose units linked by β -1,4-glycosidic bonds, is the second most abundant carbohydrate polymer on the earth. Along with an extensive interest in xylan as a one of the major source for renewable energy and raw materials, xylanase, the enzymes that can convert xylan to utilizable xylose efficiently under mild conditions, have been subjected to investigation. Multiple enzyme systems are required to efficiently degrade xylan, such as endo- β 1,4-xylanase. Most xylanase extracted from fungi and bacteria but today metagenomics could be another way to find such an enzymes. among metagenome sources camel could be an interesting choice because of feeding highly salty shrubs with Minimal nutritional value. the endoglucanase encoding gene from rumen of camel cloned into *E.coli* (*DH5a*) using pET-28a vector and then expressed into *E.coli* *BL21* (*DE3*). Enzyme as halophilic enzyme because it could tolerate 5M NaCl beside 20% of nonpolar organic solvents. optimum temperature and pH found 42($^{\circ}$ C) and 7 respectively. Enzyme was stable in room temperature for 2 days. Enzyme activity enhanced with NaCl. Enzyme also was inhibited by EDTA suggesting it is metalloenzyme. kinetic analysis also showed K_m and V_{max} , 3.71 mg/ml and 1415.48 unit/mg respctievly.

Keywords: xylan, endoxylanase, Metagenome, halophilic



Ministry of Science, Research and Technology
National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology
Institute of Industrial and Environmental Biotechnology

M.Sc. Thesis

In Microbial Biotechnology

Title:

**Cloning and biochemical characterization of a Glycoside Hydrolase
family 11 xylanase extracted from rumen of camel metagenome**

By

Mazyar etemadzade

Supervisors:

Dr. Hossein Shahbani Zahiri

Dr. Kambiz Akbari Noghabi

2016